

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Geleneksel Yöntemlerle Hazırlanan Sedir Katranının
Antikanser Etkisinin İncelenmesi

Kadir EĞİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi İsmail KOYUNCU

Şanlıurfa

2019

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Geleneksel Yöntemlerle Hazırlanan Sedir Katranının
Antikanser Etkisinin İncelenmesi**

Kadir EĞİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi İsmail KOYUNCU

Bu tez herhangi bir kurum tarafından desteklenmemiştir

Şanlıurfa

2019

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Kadir EĞİ'in hazırladığı “**Geleneksel Yöntemlerle Hazırlanan Sedir Katranının Antikanser Etkisinin İncelenmesi**” başlıklı çalışması 27/06/2019 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek Biyokimya Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

Dr. Öğr. Üyesi İsmail KOYUNCU

Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

ÜYE

Doç. Dr. Nihayet BAYRAKTAR

Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

ÜYE

Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 18/07/2019 tarih ve 2019/12/12 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışmanın hazırlanma sürecinin her aşamasında bilgilerini, tecrübelerini ve değerli zamanlarını esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi. İsmail KOYUNCU 'ya teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca;

Katkı ve desteğinden dolayı Dr. Öğr. Üyesi Ataman GÖNEL'e teşekkür ederim.

Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Nihayet BAYRAKTAR'a teşekkür ederim.

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Evren GÜMÜŞ'e, bana laboratuvar çalışma becerilerini öğreten ve bildiklerini paylaşan Moleküler Biyoloji Uzmanı Özgür YÜKSEKDAĞ'a katkı ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Her zaman büyük desteklerini hissettiğim, hayatın her safhasında iyi bir eğitim almam için hiçbir fedakarlığı esirgemeyen Anneme ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında bize inanan, bizden yardımlarını esirgemeyen, her zaman yanımızda olan Uzm. Hasine YEL'e ve Öğr. Gör. Ebru TEMİZ'e teşekkür ederim.

Değerli arkadaşlarım Öğr. Gör. Mehmet RAMAT, Öğr. Gör. Mustafa Orhan TUNCEL ve Uzm. Mehmet ENEŞ'e teşekkür ederim.

Kadir EĞİ

2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser.....	4
2.1.1. Kanser Hücreleri ve Kanser Gelişimindeki Faktörler.....	4
2.2. Kolon Kanseri.....	6
2.3. Kolon Kanseri Epidemiyolojisi	7
2.4. Kolon Kanseri Etyolojisi ve Risk Faktörleri	7
2.5. Kolon Anatomisi	8
2.6. Kanser Tedavi Yöntemleri	10
2.7. Doğal Ürünler ve Kanser Tedavisi.....	12
2.7.1. Tarihçe	12
2.7.2. Kanser Tedavisinde Doğal Ürünlerin Kullanımı	14
2.7.3. Toros Sediri (Cedrus libani A. Rich).....	16
2.7.4. Doğal Ürünlerden Özüt Hazırlama Yöntemleri.....	17
2.8. Apoptoz	17
2.9. Kanser ve Apoptoz	18
2.10. Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite.....	19
3. MATERYAL ve METOT	21
3.1. Katran Ekstrelerinin Hazırlanması	21
3.2. Materyal.....	21
3.2.1. Hücrelerin Hazırlanması	22
3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması.....	23
3.2.3. Katran Ekstrelerinin Uygulanması ve Sitotoksik Etkilerinin Saptanması	23
3.2.4 Hücre Sayımı	23
3.3. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi	24
3.4. Apoptotik Etkinin Tespit Edilmesi.....	24
3.4.1. Apoptotik Etkisinin Annexin-V ile Flow Sitometrik İncelenmesi	24

3.4.2. Acridine Orange /Ethidium Bromide Staining Metodu İle Apoptozisin Morfolojik Olarak Tespit Edilmesi.....	25
3.4.3. Cell Cycle (Hücre Döngüsü) Kiti ile Apoptotik Etkinin İncelenmesi	25
3.5. Hücre İçi Serbest Radikal Değişimi Analizi (ROS).....	26
3.6. Mitokondriyal Membran Potansiyeli (JC-1) Ölçümü	27
4. BULGULAR	28
4.1. Katran Ektresinin Sitotoksik Etkileri.....	28
4.2. Acridine Orange /Ethidium Bromide Staining Analizi	28
4.3. Flow Sitometrik Annexin-V- PI Apoptoz/Nekroz Analizi.....	29
4.4. Flow Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi	30
4.5. Flow Sitometrik Mitokondri Membran Potansiyeli (JC-1) Analizi	31
4.6. ROS (Hücre içi serbest radikal değişimi analizi)	32
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	33
6. KAYNAKLAR	36
7. EKLER.....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Kansereleşmede rol alan faktörler.....	5
Şekil 2.2. Cedrus libani kozalağı ve yaprağı	16
Şekil 2.3. Apoptoz morfolojisi.....	18
Şekil 4.1. Katran ekstresinin HCT-116 ve HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksite sonucu	28
Şekil 4.2. HCT- 116 ve HUVEC hücrelerinin acridine orange /ethidium bromide ve morfoloji görüntüleri.....	29
Şekil 4.3. HCT-116 hücresinin annexin-v analiz sonuçları	30
Şekil 4.4. Katran ekstresinin HCT-116 hücre döngüsü grafiği	31
Şekil 4.5. Katran ekstresinin apoptotik etkinlik grafiği.....	32
Şekil 4.6. Katran ekstresinin serbest radikal grafiği.....	32



KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AO: Acridine oranj

Ca+2: Kalsiyum

CO₂: Karbondioksit

DMSO: Dimetilsülfoksit

DNA: Deoksiribonükleikasit

Dulbecco's PBS: Dulbecco's Balanced Salt Solution

EB: Ethidium bromide Staining

EDTA: Etilendaimintetraasetik asit

FBS: Fetal bovine serum

FDA: Gıda ve İlaç Dairesi

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

HCO₃: Bikarbonat

HCT-116: İnsan kolon karsinomu

HUVEC: İnsan embriyonal hücre hattı

IC₅₀: Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu

KRK: Kolorektal Kanserler

LDH: Laktat Dehidrogenaz

M.Ö.: Milattan Önce

M.S.: Milattan Sonra

mL : Mililitre

mm: Milimetre

NaHCO₃: Sodyum bikarbonat

O₂: Süperoksit Radikali

PBS: Phosphate Buffered Saline

ph: Hidrojenin Gücü

PI: Propidyum İyodid

PS: Fosfodilserin

R: Organik Radikaller

RO: Alkoksi Radikaller

ROO: Peroksit Radikaller

ROS: Hücre içi serbest radikal

RS: Tiyil Radikaller

RSO: Sülfenin Radikaller

RSO₂: Tiyil Peroksit Radikaller

SARM: Seçici Androjen Reseptör Modülatörleri

SERM: Seçici Östrojen Reseptör Modülatörleri

SİAS: Spina İliaka Anterior Süperior

TNF: Tümör Nekroz Faktör

TRAIL: TNF- ilişkili Apoptozisi İndükleyen Ligand

XTT: 2,3-Bis(2-metoksi4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum

µg : Mikrogram

µL : Mikrolitre

ÖZET

GELENEKSEL YÖNTEMLERLE HAZIRLANAN SEDİR KATRANININ ANTİKANSER ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Kadir EĞİ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Kanser, dünya genelinde ölümlerin önde gelen nedenleri biri olup, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ilk sırada gelen ölüm nedenidir. Rektal kanser ile beraber incelendiğinde kolorektal kanserler (KRK), erkeklerde prostat ve akciğer, kadınlarda meme ve akciğer kanserinden sonra üçüncü sırada görülmektedir. Kanser tedavisinde; dokunun tipine, kanserin evresine, kanserin karakterine kanserin bulunduğu dokuya ve hastanın fizyolojik özelliklerine göre farklı tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Kanser tedavisi için rutin olarak kemoterapi kullanılır. Kemoterapi kanserli hücreler üzerine toksik etki gösterirken, bununla birlikte sağlıklı hücreler üzerine de toksik etki göstererek organların tahrip olmasına neden olmaktadır. Kemoterapinin istenmeyen bu yan etkileri ölüm ile sonuçlanabilmektedir. Bu nedenle günümüzde en az toksisite ile kansere daha etkili bir tedavi sağlamak amacıyla bitkiler gibi doğal kaynaklı ilaçlara bir yönelim olmuştur. Bu tez çalışmamızda sedir katranı HCT-116 ve HUVEC hücreleri üzerinde apoptotik etkisi Annexin-V, MTT, Cell Cycle (Hücre Döngüsü) yöntemiyle ve apoptozun diğer bir belirteci olan mitokondral membran potansiyeli JC-1 “(5,5',6,6'-tetrachloro1,1',3,3'-tetra methyl benzimidazolyl carbocyanineiodide)” ile apoptotik etkinlik incelendi ve morfolojik görüntüleri de Acridine orange /Ethidium bromide boyama yöntemleri ile tespit edildi. Çalışmanın sonucunda katran ektresinin IC50 değeri 30 µg/mL değerlerin antiproliferatif etki gösterdiği tespit edildi. Katran HCT-116 hücresi üzerinde apoptotik etki gösterdiği ve hücrelerin %70'i G0-G1 fazında tutulduğu gözlemlendi. Ayrıca apoptotik etkinin ROS artışıyla korelasyon gösterdiğide tespit edildi. Bu çalışmada katranın bazı kimyasal ve biyolojik aktivite özellikleri incelenerek elde edilen veriler sonucunda, bu maddelerin hipoksi, 3 boyutlu hücre kültürü ortamlarında ve ardından hayvan deneyleri gibi yeni projelere ışık tutacak ve özellikle kanser tedavisi için yeni bir bitkisel ilaç adayı olup olmayacağı tespit edilecektir.

Anahtar Kelimeler: HCT-116, Sitotoksite, Kolon kanseri, MTT

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF ANTICANCER EFFECT OF CEDAR TAR PREPARED BY TRADITIONAL METHODS

Kadir EĞİ

Medical Biochemistry Department, Master Thesis

Cancer is one of the leading causes of death worldwide and is the leading cause of death after cardiovascular diseases. When examined together with rectal cancer, colorectal cancers (CRC) are seen in the third place after prostate and lung in men and breast and lung cancer in women. In the treatment of cancer; Different treatment methods are applied according to tissue type, stage of cancer, character of cancer, tissue of cancer and physiological characteristics of patient. Chemotherapy is routinely used for cancer treatment. Chemotherapy has toxic effects on cancer cells, but also on healthy cells, causing toxic damage to organs. These undesirable side effects of chemotherapy can result in death. Therefore, there has now been a tendency towards drugs of natural origin to provide a more effective treatment for cancer with minimal toxicity. In this study, apoptotic effect on cedar tar HCT-116 and HUVEC cells by Annexin-V, MTT, Cell Cycle method and mitochondrial membrane potential, another marker of apoptosis JC-1 " (5,5 ', 6,6). Apoptotic activity was examined with et-tetrachloro1,1 ', 3,3'-tetra methyl benzimidazolyl carbocyanine iodide) and morphological images were determined by Acridine orange / Ethidium bromide staining methods. As a result of the study, it was found that IC50 value of tar extract 30 µg / mL showed antiproliferative effect. It was observed that tar had apoptotic effect on HCT-116 cell and 70% of the cells were kept in G0-G1 phase. In addition, apoptotic effect correlated with ROS increase. In this study, as a result of the data obtained by examining some chemical and biological activity properties of tar, these substances will shed light on new projects such as hypoxia, 3-D cell culture environments and then animal experiments and it will be determined whether or not they will be a new herbal medicine candidate for cancer treatment.

Keywords: HCT-116, Cytotoxicity, Colon cancer, MTT

1. GİRİŞ

Kanser, dünya genelinde morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biri olup, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ilk sırada gelen ölüm nedenidir. (1-4). Kanser günümüzde özellikle gelişmiş toplumlarda önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. İnsan ömrünün uzaması ve sanayileşmenin bir yaşam şekline dönüşmesi sebebiyle ile kanser vakaları da bunlara paralel olarak artmıştır. ‘Her yıl on milyondan daha fazla kişi kanser hastalığı yakalanmakta ve yedi milyona yakın insan da kanser nedeni ile hayatını kaybetmektedir. Jemal ve ark. (5) yaptıkları son çalışmada 2016 yılında, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde bir buçuk milyondan fazla yeni kanser vakası ve 600.000'e yakın ölümünün kanser sebebiyle meydana geleceği düşünülmektedir. Küresel olarak, kanser ölümlerinin sayısının 2002'de 7,1 milyondan 2030'da 11,5 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir (2).’

Günümüzde, kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemler, immunoterapi, gen tedavisi ve alternatif tedavi gibi çeşitli yöntemler birlikte veya ayrı ayrı uygulanmaktadır. Bu yöntemler arasında en sık kullanılan yöntem kemoterapidir. Kemoterapinin en büyük handikapı kanserli hücreleri öldürürken normal hücreyi de tahrip etmesidir. Bu nedenle günümüzde en az toksisite ile kansere daha etkili bir tedavi sağlamak amacıyla bitki kökenli ilaçlara bir yönelim olmuştur. Örneğin, yaygın bir kemoterapötik ajan olan flüorourasil, miyelotoksisite (6), kardiyotoksisiteye (7), doksorubisinin kalp toksisitesine (8,9), renal toksisiteye (10) neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kemoterapinin ilaç toksisitesi ve ilaç direncinin ortaya çıkması tedavideki yetersizliğin başlıca nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (11).

Güçlü ve düşük yan etkiye sahip, kansere karşı yeni ilaçların geliştirilmesi ve keşfedilmesi üzerine çok sayıda çalışma yapılmaktadır (12,13,14). Günümüzde, kanser tedavisi için kullanılan ilaçların %60'ı doğal ürünlerden elde edilmektedir. Klinikte yaygın olarak kullanılan doğal bileşikler arasında bitkisel kaynaklı olanların sayısı oldukça fazladır (15-22). Doğal ürünlerden geliştirilen ilaçlar ham özütlerinden veya özütlerden izole edilen bileşiklerden kaynaklanır (23-29). Günümüzde kemoterapi amacıyla kullanılmakta olan antitümör etkisi kanıtlanmış vinka alkaloidler (vinkristin,

vinblastin), taksanlar (paklitaksel), kampoteşinler (topotekan) ve epipodofilotoksinler (etoposid) gibi pek çok bitkisel kökenli bileşik bulunmaktadır (30-33).

Çeşitli çalışmalarda doğal ürünlerin ham özütlerinin, antitümöral aktiviteye sahip çeşitli moleküller içerdikleri ve bunların bazılarının kanser hücrelerini öldürmekte oldukça etkili oldukları gösterilmiştir (34-37). Ancak bitki özütlerinden elde edilen tek bir maddenin kendi başına kullanılması yerine, bitki özütü içerisindeki tüm bileşiklerin kompleks etkileşimleri (sinerjistik ve/veya antagonist etkileri) nedeniyle total bitki özütlerinin kullanılmasının bazı durumlarda daha etkili olduğunu ileri süren çalışmalar vardır (38-40). Ayrıca aynı cinse ait farklı türler içerisinde, aynı etken maddelerin farklı dozlarda bulunabileceği gösterilmiştir (41,37,42).

Bitki özütlerinin ve/veya bileşenlerinin antitümöral etkileri özellikle hücre büyümesi, DNA replikasyonu, apoptotik hücre ölümü, invazyonu ve metastazında rol alan sinyal iletim yollarında görevli hedef moleküller ile ilişkili olarak bulunmuştur (19,43-46).

Bu çalışmada'da; Türkiyede Toros dağlarında (Tarsus) yetişen ve halk arasında yüzyıllardır kullanılan, etnofarmosötik özelliğe sahip katran(sedir) ağacından geleneksel yöntemlerle elde edilen katranın antikanser aktivitesi incelendi.

Katran veya sedir ağacı olarak isimlendirilen *Cedrus libani* çamgiller (*Pinaceae*) familyasında yer alan herdem yeşil kozalaklı ağaçlardandır. Lübnan, Suriye ve Türkiye'de yayılış göstermekte olup, Türkiye'de çoğunlukla 800-2000 metre yükseltiler arasında Toros dağlarında yayılış göstermektedir. Katran ağacı, geçmişten günümüze yayılış gösterdiği alanlarda ve yakın çevrede bulunan medeniyetler tarafından kutsal bir ağaç olarak görülüp, güç, kudret ve ihtişamın bir sembolü olarak kabul edilmiştir (47,48). Katran ağacı ve kuzenlerinin esansiyel yağlar ve odun özütü (katran) de değişik amaçlar için kullanılmaktadır. Atlas ve Himalaya sedirinden elde edilen yağ, Fas, Hindistan ve Nepal'de sabunların kokulandırılmasından parfümeriye, birçok hastalığın tedavisinden (bronşit, tüberküloz, cilt hastalıkları, romatizmalı rahatsızlıklar, ülser ve bel soğukluğu) ölüleri yakma işlemine kadar çok çeşitli alanda kullanılmaktadır (49).

Toros dağlarında katran ağacının yayılış alanlarında yaşayan halk, günümüzde halen dededen toruna aktarılan kültürel bir miras şeklinde sedir odunundan katran

çıkartıyor (50,51). Katran, yöre halkı tarafından küçükbaş ve büyükbaş hayvanların vücuduna dışardan uygulanarak uyuz hastalığına ve kene, atsineği, sivrisinek gibi parazitlere karşı uzaklaştırıcı (repellent) ve öldürücü (pestisit) olarak kullanılıyor. Yöre halkı katranı, düşük derişimlerde olmak üzere (bir kova suya birkaç damla), hayvanların içme sularına da karıştırmaktadır. Bu karışımı içen hayvanlarda, iç parazitlerin etkisiz hale geldiği ve hayvanların daha sağlıklı olduğuna inanılıyor (51). Katran ağacının ibre, kozalak, tohum ve kabuğundan elde edilen yağların birçok zararlıya (bakteri ve sivrisinek gibi) karşı etkili olduğu bilimsel olarak da kanıtlanmıştır (52,53). Yöre halkı hayvanlarının yanı sıra, insan sağlığı içinde katranı şurup şeklinde hazırlanıp içilmesiyle de ülser, iç parazitler, karın ağrısı gibi şikâyetlere karşı tedavide kullanmaktadırlar (51).

Geleneksel tedavi modelleri içinde yer alan sitotoksik kemoterapi, hala birçok kanser türü için tercih edilmektedir (54- 58). Kemoterapi amaçlı kullanılmakta olan sitotoksik maddeler, bölünme evresindeki bir hücreyi, durağan fazdaki bir hücreye oranla daha fazla etkilemektedir (59). Bu nedenle, kullanılacak olan maddenin sitotoksik etkisinin saptanması büyük önem taşımaktadır (60). Kanser tedavilerinin başarısı yüksek oranda normal dokunun yaşamasını sağlayıp, kanser hücresinin yok edilmesine bağlıdır. Tedavide öncül neoplastik hücrelerin yok edilmesi amacıyla proliferasyonun durdurulması veya apoptozun başlatılması önemli bir adım olarak kabul edilir (61-63).

Apoptoz kontrolünün bozulması kanser oluşumunda önemli rol oynar. Kanser hücrelerinin normal apoptotik süreçten sürekli kaçma eğilimindedirler. Kanser hücreleri ya antiapoptotik proteinlerin aşırı aktivasyonu ya da proapoptotik proteinlerin baskılanmasıyla apoptoza dirençli bir nitelik kazanırlar (64-67). Apoptoz, hücre içinden gelen uyarılarla veya hücrenin dışından gelen çeşitli uyarılar ile tetiklenebilmektedir. Kanser ilaçlarının birçoğu apoptozu uyaran yolaklarda iş görmektedir (68).

Bu çalışmada katranın bazı kimyasal ve biyolojik aktivite özellikleri incelenerek, kanser tedavisine yeni bir bitkisel ilaç adayı olup olmayacağı tespit edilecektir. Bu çalışmadan elde edilen veriler sonucunda, bu maddelerin hipoksik koşullarda, 3 boyutlu hücre kültürü ortamlarında ve ardından hayvan deneyleri gibi yeni projelere ışık tutacak, özellikle kanser tedavisi için yeni ve özgün çalışma alanları doğuracaktır. Ayrıca bu çalışma ile kanser tedavisinde büyük bir öneme sahip olan doğal ürünlerden elde edilen ilaç çalışmalarının teşvik edilmesi amaçlanmıştır

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, epigenetik ve genetik olayların hücrel birikimine bağlı çok faktörün rol aldığı kompleks bir hastalıktır. Doğal bir süreç ve/veya çevresel faktörlerin etkisi ile genlerde meydana gelen değişiklikler sonucunda hücrelerin kontrolsüz olarak bölünmesiyle ortaya çıkar (69,70). Kanser, normal dokularda hücre ölümünün ve çoğalmasının arasındaki dengeyi sağlayan homeostatik kontrol mekanizmasının hasar görmesi sonucunda gelişmektedir (71).

Kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemler, immunoterapi, gen tedavisi ve alternatif tedavi gibi çeşitli yöntemler birlikte veya ayrı ayrı uygulanmaktadır (59). Bu yöntemler arasında en sık kullanılanı kemoterapidir (55).

Günümüzde kansere yakalanan bireylerin sayıları giderek artmaktadır. Küresel olarak, kanser ölümlerinin sayısının 2002'de 7,1 milyondan 2030'da 11,5 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir (2). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı 2012 yılında 14 milyondan fazla yeni kanser vakası, 8 milyondan fazla kanser nedeniyle ölüm ve 32,56 milyon kanserle yaşayan insan olduğunu bildirmiştir (73). Kanser, 21. yüzyılda hala dünyadaki en önemli bir halk sağlığı sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. Tanı ve tedavideki ilerlemelere rağmen hastaların genel olarak sağ kalımı hala düşük orandadır (61).

2.1.1. Kanser Hücreleri ve Kanser Gelişimindeki Faktörler

Kanser hücreleri, normal hücre çoğalmasını, farklılaşmayı ve sağ kalımını düzenleyen mekanizmalardaki anomalilerden kaynaklı kontrolsüz olarak çoğalmaya başlarlar. Devamlı bölünerek normal doku ve organları istila edip yayılırlar. Kanser hücreleri, normal hücrelerden farklı olarak hücre dışı büyüme etkenlerine daha az ihtiyaç duyarlar. Hücre çoğalmasında etkili olan hücre içi sinyal yollarındaki proteinlerin veya büyüme faktörü reseptörlerinin kontrolsüz aktivitesinden dolayı, kanser hücreleri çoğalmayı sağlayan büyüme faktörlerini kendileri salgılayabilirler, bu da otokrin çoğalma uyarımı ile hücrenin sürekli olarak çoğalmasına neden olur. (Şekil 1). Ancak, in vitro koşullarda çoğalabilmek için büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar.



Şekil 2.1. Kanserleşmede Rol Alan Faktörler

Kültür ortamında normal fibroblastlar diğer komşu hücelere temas ettikleri anda gelişmelerine son verirler ve çoğalmazlar (kontakt inhibisyon). Böylece normal hüceler birbirlerine tutunarak düzenli bir şekilde kültür kabında yer kaplarlar. Ancak, tümör hüceleri komşu hücelere temas ettiği zaman bile hareket etmeye devam ederek çok katlı düzensiz kümeler halinde çoğalmaya devam ederler. Kanser hüceleri, kontrolsüz olarak çoğaldıkları için normal biçimde farklılaşamazlar ve farklılaşmanın erken evrelerinde kalırlar (73,61).

Kanser hüceleri, normal dokunun içerisine girebilmek için hücre dışındaki matriks bileşenlerini parçalayan proteazlar salgılayarak invazyon özelliği gösterirler. Tümörün büyümenin sürekli olarak ilerlemesi için yeni kan damarlarının oluşturulması (anjiyogenez) gereklidir. Bu damarlar, tümör hücelerinin salgıladığı ve çevre dokuların damarlarındaki endotel hücelerinin çoğalmasını uyaran büyüme faktörlerine cevap olarak ortaya çıkar. Bu da tümör hücelerinin gelişen yeni kılcallara rahatça girebilmesini ve kanser hücelerinin dolaşıma katılarak metastatik yayılımı başlatmasına olanak sağlar (74,75).

Onkogenler, p53 ve Rb gibi tümör baskılayıcı genlerde oluşan mutasyonlar da kanser gelişmesine neden olmaktadır. Fakat bu durum kanser hücrelerinin kromozomal bozukluklarını ve biyoçeşitliliğini açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Farklı bir görüşe göre ise, hücre bölünmesini kontrol eden genlerde meydana gelen bir mutasyon anormal replikasyona, delesyona ve duplikasyona yol açarak hücrelerin belli bir proteini gereğinden az veya fazla üretir. Eğer kromozomal aberasyonlar hücre döngüsünü kontrol eden büyüme faktörlerinin üretimini veya tümör baskılayıcılar gibi bir veya daha fazla proteini etkilerse kanser ortaya çıkabilir. Ayrıca, hücre döngüsü, DNA hasar tamiri ve apoptozda görevli olan genlerin aşırı metillenmesinin de bazı kanser türlerinde karakteristik olarak görüldüğüne dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Kanser gelişimine yol açabilecek farklı birçok mekanizma olabilir. Bu durum da kanserin nedeninin belirlenmesini daha da güçleştirmektedir (76).

2.2. Kolon Kanseri

Kolon adenokarsinomu, değişik toplumlarda farklı sıklıkta görülmesine rağmen mide-bağırsak sistemin en sık karşılaşılan kanseridir. Tüm dünyada ciddi bir morbidite ve mortalite nedeni olan bu tümörlerin, yılda yaklaşık 1.000.000'dan fazla insanda ortaya çıktığı düşünülmektedir. Rektal kanser ile beraber değerlendirildiğinde kolorektal kanserleri (KRK), erkek bireylerde prostat kanserinden ve akciğer kanserinden sonra, kadın bireylerde meme kanserinden ve akciğer kanserinden sonra üçüncü sırada en çok görülmektedir. Erkek ve kadın bireylerde görülen tüm kanserlerin %10'unu kolorektal kanserler oluşturmaktadır. İstatistiksel verilerin güvenilir olduğu ABD'de de kanserden kaynaklı ölüm sebepleri arasında kolorektal kanserler ikinci sırada bulunmaktadır (118).

Kolorektal kanserlerin bölgesel dağılımında anlamlı ve çeşitli farklılıklar bulunmaktadır. Sanayileşmiş batı toplumlarında yaşam süresinin uzaması, diyet ve çevresel faktörlerin etkisi ile kolorektal kanserlerle daha fazla karşılaşılmaktadır (119). Kolon kanserleri genelde cins ve ırk farkı dikkati çekmezken, rektum kanserleri daha baskın olarak beyaz ırkta gözlenmektedir (120).

2.3. Kolon Kanseri Epidemiyolojisi

Kolon kanseri kanserden kaynaklı ölüm nedenleri arasında erkek bireylerde prostat ve akciğer kanserinden sonra kadın bireylerde ise meme ve akciğer kanserlerinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır (118). Kolorektal kanserler, en fazla endüstrileşmiş batı toplumlarında görülmektedir ev tüm dünyada yaygın olarak görülen ve kanser kaynaklı ölümlerin %10'undan sorumludur (122). En çok görülme oranları ABD, Avustralya ve Yeni Zelanda'da; en az oranları Hindistan, Güney Amerika ve Ortadoğu ülkelerinde görülmektedir (123). Türkiye Sağlık Bakanlığı verilerine göre kolorektal kanserler tüm kanserler içinde insidans açısından erkek bireylerde dördüncü, kadın bireylerde ise ikinci sırada yer almaktadır. İnsidansı erkek bireylerde yüzde 1,6 ve kadın bireylerde yüzde 1,2 olarak bildirilmektedir (124).

2.4. Kolon Kanseri Etyolojisi ve Risk Faktörleri

“Genetik yatkınlık en belirgin risk faktörü olmakla beraber kolorektal kanserlerin büyük çoğunluğu sporadik kanserlerdir”.

Kolon kanserinin gelişiminde etkisi olan risk faktörleri arasında; yaş, adenom ya da karsinom öyküsü, diyet, çevresel faktörler, bilhassa inflamatuvar barsak hastalığı olmak üzere diğer predispozan hastalıklar ve pozitif aile öyküsünün olması sayılabilir (122,125,126).

Yaş: Dünya genelinde kolorektal kanserli hastaların %90'ı ve daha fazlası 50 yaş üzerinde olup ileri yaş hali de bir risk faktörüdür. Yaşın ilerlemesi ile birlikte artan kolonik mutasyonlar bunun sebebi olarak gösterilebilir (127).

Diyet: Kolorektal kanserin çok fazla görüldüğü batı toplumlarında total kalorisinin %40-45 doymuş ve doymamış yağ oranı iken, az gelişmiş ve gelişmekte olan toplumlarda yağ oranı total kalorisinin %10-15'ini oluşturur (128). Yani et ve yağ oranı yüksek gıdalarla beslenmenin antioksidan, antimutajen, vitamin ve eser elementlerden yoksun, lifsel komponenti olmayan beslenme alışkanlığının tümör oluşumunda büyük bir rolü vardır. Bunlar kolondaki mukoz epitel hücrelerinin yenilenme direncinin ve mukus kalitesinin kaybına neden olmaktadır (129).

Epidemiyolojik çalışmalarda sebze ve meyvenin bol tüketimi, kolon kanseri riskiyle ters orantılıdır. Diyetteki lif, dışkıının hacmini ve buna bağlı geçiş hızını arttırarak

intraluminal karsinogenleri mukoza ile temasını azaltır. Ayrıca lif yönünden zengin gıdalar, barsaktaki karsinogen safra asitlerinin yoğunluğunu azaltırlar (125,126)

İnflamatuvar Barsak Hastalığı: Kronik ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olan bireylerde kolon kanser riskinin hastalığın süresine ve yaygınlığına bağlı olarak arttığı bilinmektedir. Bu grupta ortalama en düşük kanserleşme oranı %3 ve en yüksek kanserleşme oranı %8 olmaktadır, hastalığın başladıktan 10 yıl sonra kanserleşme oranı %10'a, 25 yıl sonra ise kanserleşme oranı %30'lara kadar yükselmektedir. Pankoliti olan bireylerde daha sık görülen kanserler, çoğu defa multifokal gelişim gösterirler (130). Yine, ülseratif kolit ile birlikte primer sklerozan kolanjit de varsa riskin daha çok olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (131). Crohn hastalığı olanlarda kolon kanseri tüm toplumdan daha erken yaşlarda görülür ve çoğu müsinöz karsinom olup cerrahi bypass uygulanan segmentte veya striktür gelişen segmentte daha sık görülür. Klinik bulgular (rektal kanama, dışkılama alışkanlığında değişiklik) altta yatan hastalık tarafından taklit edilmesi sebebiyle tanı daha zor ve geç konur.

Diabetes Mellitus: Kolorektal karsinogenezin abdominal obezite ve insülin direnciyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. İnsülin normal mukozada apoptozu azaltır ve böylece kolorektal adenom gelişimini uyararak adenom-kanser gelişme zincirini erken uyarabilir (132,133).

Obezite: Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda bel çevresi, bel-kalça oranı ve kolon kanseri arasında ilişki gösterilmiştir. Fiziksel aktivite kolon kanseriyle ters ilişkili bulunmuştur (132-134).

Adiponektin, adipoz dokudan salgılanan bir mediatördür ve obezitede adiponektin düzeyi azalmaktadır. Yapılan bir çalışmada kolorektal adenom sayısı ve adenomun boyutu, artmış visseral yağın birikimi ve azalmış plazma adiponektin düzeyiyle ilişkili bulunmuştur (132).

2.5. Kolon Anatomisi

İleumundan itibaren anüse kadar uzanan ve yaklaşık 150 cm uzunluğunda olan kalın barsak, sindirim kanalının 1/5'ini oluşturur. Hem periton içinde ve hem de retroperitoneal alanda yer alır. İleum ile çekumun birleşme yerinde ileoçekal valv denilen, kolon içeriğinin ileuma geçişini engelleyen bir kapak sistemi vardır. Longitudinal kas

lifleri biraraya gelerek kolon duvarında tenya denilen üç adet bandı meydana getirirler. Tenyalar sirküler kas tabakasından ve barsak uzunluğundan daha kısadrlar ve bu nedenle kolon büzüşmüş ve haustra denilen kesecikler oluşturmuştur. Kalın barsağın dış yüzünde periton ile örtülü yağ dokusu uzantıları görülür. Bunlara apendices epiploica denir. Kalın barsaklar; karaciğer, dalak, mide, duodenum, ince barsak, böbrekler, üreterler ve mesane gibi organlarla komşuluk gösterir (121).

Çekum: Kalın barsağın ilk parçası olan çekum, sağ iliak fossada yer alır. Uzunluğu ortalama 6 cm, genişliği ise 7,5 cm olup kolonun en geniş kısmıdır. Geniş bir lümeneye sahip olması ve duvarının ince olması nedeni ile intestinal obstrüksiyonlarda kolonun en sık perforasyon olan kısmıdır (121). Arka yüzü iliakus ve psoas majör kasları ile komşudur. Çekum genelde mobildir ancak bazen terminal ileumdan gelen bir periton katlantısı çekumun fikse olmasına neden olabilir.

Apendiks Vermiformis: Çekumun arka duvarından, ileoçekal valvin 2-3 cm altından ve üç tenyanın birleştiği yerden çıkar. Ortalama uzunluğu 9 cm (2-25 cm) dir. Çocuklarda yetişkinlerden daha uzundur. Tabanı spina iliaca anterior superior (SİAS) ile umblikusu birleştiren çizginin dış 1/3 noktasındadır (Mc Burney noktası). Apendiksin farklı konumlarda olabileceği saptanmıştır; retroçekal veya retrokolik, pelvik, subçekal, preileal veya postileal yerleşim gösterebilir. Apendiks vermiformis ileum mezenterinin alt ucuna kısa bir mezoapendiks ile bağlıdır. Apendiks arteri ileokolik arterin alt parçasının bir dalıdır.

Assendan Kolon: Assendan kolon, çekumdan itibaren karaciğerin sağ alt lobunun alt yüzüne kadar uzanır ve burada birden sola ve biraz öne bükülerek hepatik fleksurayı oluşturur. Assendan kolonun ön ve yan yüzleri periton ile örtülü olup uzunluğu yaklaşık 15–20 cm kadardır (121). Arka yüzü gevşek bağ dokusu ile karın arka duvarına tutunur. Bazen arka yüzü peritonla örtülü olabilir. Ön yüzü ileum, omentum majus ve karın ön duvarı ile komşudur. İçte duodenum, ince barsaklar ve psoas majör kası ile dışta ise karın yan duvarı ile komşudur. Arkada iliak kas iliolumbar ligament, quadratus lumborum kası, transversus abdominus kasının aponevrozu ve sağ böbrek ve sağ üreter ile komşuluk gösterir.

Transvers Kolon: Transvers kolon, hepatik fleksura ile splenik fleksura arasında uzanır ve yaklaşık 50 cm uzunluğundadır (121). Dalağın alt ucunun altında aşağı doğru bükülerek splenik fleksurayı yapar. Transvers kolonun sağ ucu duodenum ikinci

parçasına ve pankreas başına tutunmuştur. Üst yüzü karaciğer, safra kesesi, mide büyük kurvatur ve dalak ile komşudur. Arkada duodenum inen kısmı, pankreas başı, treitz ligamenti ve ince barsaklarla komşuluk yapar. Önde karın ön duvarı ve ince barsaklarla komşudur.

Descendan Kolon: Descendan kolon ise splenik fleksuradan başlayıp sol iliak fossaya kadar uzanır. Yaklaşık 25 cm uzunluğunda olan bu kolon segmenti en kalın kas tabakasına sahip kısımdır. Descendan kolonun da yan ve ön yüzü peritonla örtülüdür (121). Splenik fleksurayı yerinde tutan splenokolik ve frenokolik ligamentler bu bölgenin mobilizasyonu sırasında, dalağın hasar görmemesi için dikkatle ayrılmalıdır. Sol böbreğin dış kenarı ve quadratus lumborum kası arasında iliak kristaya kadar iner ve küçük pelvis içerisinde sigmoid kolon ile sonlanır. Arkada sol böbrek, iliakus, psoas majör ve quadratus lumborum kasları ile komşudur. Sol subkostal arter ve sinir, sol iliohipogastrik, sol ilioinguinal, genitofemoral ve lateral kutaneal femoral sinirler, sol testiküler (ovarian) arter ve sinir, sol eksternal iliak arter inen kolonu arkadan çaprazlarlar.

Sigmoid Kolon: Sigmoid kolonun uzunluğu 40 cm olup 2,5 cm çapı ile kolonun en dar yerini oluşturmaktadır (121). Psoas majör kasının iç kenarından başlar, bir kıvrım yapar ve üçüncü sakral vertebra hizasında rektumla devam eder. Uzunluğu değişebilen bir mezokolon ile karın arka duvarına tutunmuştur. Sigmoid kolon lateralda eksternal iliak damarlar, obturator sinir, over (kadında), duktus deferens (erkeklerde) ve pelvis yan duvarı ile komşudur. Arkada internal iliak damarlar, üreter, priformis kası ve sakral pleksus ile komşudur. Sigmoid kolonun alt kısımlarında tenyalar incelmeye başlar ve rektuma yakın kısımda tamamen kaybolur. Tenyaları oluşturan lifler rektumu saran longitudinal kas tabakası ile uzanırlar.

2.6. Kanser Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavisi kanserin tipine, oluşum yerine, ilerleme durumuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Sıklıkla ilk seçenek olan cerrahi yöntem, solid tümörlerin çıkartılmasında kullanılır. Erken evre kanserlerde ve benign tümörlerde tek tedavi yöntemi olabilir. Radyasyon, doğrudan tümörü hedef alan yüksek enerjili ışınlar kullanarak kanserli hücreleri öldürür. Esas olarak DNA'ya hasar vererek ve

replikasyonunu engelleyerek görev yapar. Bu nedenle hızla bölünen kanser hücrelerini öldürür. Ayrıca kısmen bölünmekte olan normal hücreleri de öldürür. Cerrahi ve radyasyon yöntemleri sıklıkla birlikte kullanılmaktadır.

Kemoterapi ilaçları hızla büyüyen hücreleri hedefleyen toksik bileşenlerdir. Bu ilaçların çoğu DNA replikasyonu için gereken öncü moleküllerin sentezini engellemeyi hedefleyerek tasarlanır ve hücrenin S fazını tamamlaması engellenir. Kemoterapi ilaçları geniş çaplı olarak DNA hasarı oluşturur ve replikasyonu durdurur. Mitoz mekiğini oluşturan iğ ipliklerini baskılayan ilaç sınıfı, hücre replikasyonunu mitozun erken evrelerinde durdurur. Mitoz süresince kromozomların ayrılması için mikrotübüllere (iğ iplikleri) ihtiyaç duyulur. Mitotik iği baskılayan ilaçlar mikrotübüllerin sentezini durdurur (18). Yetişkin hücrelerin birçoğu sık sık bölünmediğinden, bu tip ilaçlara kanser hücrelerinin olduğundan daha az duyarlıdır. Kemoterapi ilaçları ayrıca gastrointestinal sistem hücreleri, kemik iliği hücreleri ve saç folikülleri gibi daha hızlı bölünen hücreleri de öldürürler. Bu da gastrointestinal rahatsızlıklar, düşük akyuvar sayısı ve saç kaybı gibi bazı kemoterapiye bağlı yan etkileri ortaya çıkartır (61).

Normal hücre büyümesini etkileyen birçok faktörden biri de hormonlardır. Kanser hücreleri her ne kadar büyüme faktörlerine karşı cevap verme özelliklerini kaybetmiş olsalar da, bazı kanser hücreleri büyümek için büyüme hormonlarına ihtiyaç duymaktadır. Kansere karşı hormon tedavisi kanser hücrelerini bu hormonlardan yoksun bırakmayı amaçlar. Her ne kadar bazı ilaçlar hormonun sentezini engellese de bu iş genellikle hormonun aktivitesini engelleyen ilaçlar ile yapılır. Örneğin, bazı meme kanseri hücreleri büyümek için östrojene ihtiyaç duyar. Östrojenin bağlanma bölgesini engelleyen ilaçlar kanserin ilerlemesini yavaşlatabilir. Bu ilaçlara seçici östrojen reseptör modülatörleri (SERM) veya anti-östrojenler adı verilir. Tamoksifen ve Raloksifen bu tip ilaçlara örnektir. Benzer olarak, testosteron (androjen hormon) bazı prostat kanser hücrelerini uyarır. Seçici androjen reseptör modülatörü (SARM) adlı ilaçlar testosteronun kanserli hücrelere bağlanmasını engeller ve kanserli hücrenin büyümesini durdurur (77,78,79). Yeni kemoterapötik ilaçlar ise kanser oluşumu ile ilişkili reseptörleri, büyüme faktörlerini veya kinazlar gibi hücre sinyal yollarını ve çeşitli aktif hücre proteinleri hedefler (80).

Bazı kanser hücreleri bazı ilaçlara karşı direnç geliştirdiklerinden kemoterapi başarısız olabilir. Toksik ilaçlar ile mutasyona uğrayan ve ilaca direnç geliştiren kanser

hücreleri ilaca dirençli bir tümör gelişimine neden olur. Bu probleme karşı kemoterapi ilaçları kombinasyonlar oluşturularak kullanılmaktadır. Bazı kanser hücrelerinde MDR1 (multi-drug resistance/çoklu ilaca direnç)'in aşırı gen ifadesi gözlenir ve bu gen sadece birtakım ilaçların hücre içine girmesini engellemekle kalmaz, aynı zamanda hücrenin içindeki ilaçların da dışarı atılmasına yol açabilir ve tedavinin başarısız olmasına neden olur (81).

Kanserde bağışıklık sistemi hücreleri, kanser hücrelerini yok etmekte yetersiz kalabilir. İmmünoterapi, immün sistem hücrelerinin kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için kullanılabilir. Buna örnek olarak bazı kanser tedavilerinde kullanılan interlökin-2 ve interferon alfanın immün cevabı arttırdığı ileri sürülmüştür (82,83).

Bir diğer tedavi tipi olan kemo-immünoterapide, kanser hücresine özgü olan antikolar ilaçlara eklenerek kullanılır. Bu moleküller kanser hücresine özgü olan antikor ve kanser hücresine girince toksik özellik gösteren ilaç olmak üzere iki kısımdan oluşur. Antikor, ilacı doğrudan kanserli hücreye taşır ve böylece kemoterapinin yan etkilerini azaltmak mümkün hale gelir. Diğer benzer bir strateji ise radyoimmünoterapidir. Bu tedavi modelinde de belli antikorlar radyoaktif atomlara bağlanır ve ölümcül radyasyonu hedef kanserli hücreye taşır (84).

2.7. Doğal Ürünler ve Kanser Tedavisi

Kanser tedavisi için ilaç geliştirme çalışmalarında doğal ürünler çok önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Tıbbi kullanımdaki doğal ürünler ve bileşikler binlerce yıldan bu yana bitkiler, hayvanlar veya mikroorganizmalar gibi doğal kaynaklardan elde edilmektedir.

2.7.1. Tarihçe

Bilinen en eski yazı M.S. 2600 civarında antik Mezopotamya'da bulunmuştur ve yüzlerce kil tablet üzerine çivi yazısı ile yazılmıştır. Bu tabletler Cedrus türleri (Sedir), Commiphora myrrha (mürrüsafi) reçinesi, Papaver somniferum (haşhaş) suyu, 1000'e yakın bitkiden bahseder. Bu bitki ve formülasyonların birçoğu günümüzde halen kullanılmaktadır. M.S. 1550 civarına tarihlenmiş olan antik Mısır Ebers papirüsünde

800 civarı karmaşık reçete ve Aloe vera (aloe), Boswellia carteri (buhur) ve Ricinus communis (hintyağı) gibi ajanların da bulunduğu 700'den fazla doğal ajan bulunmaktadır. Hippokrat (M.Ö. 460-377 civarı) 400'den fazla doğal ajan toplamış ve bunların kullanım şeklini Corpus Hippocratum'da yayınlamıştır. Kavun suyunun laksatif, Ornithogalum caudatum (adasoğanı)'nın ise diüretik etkisinden bahsetmiş ve Atropa belladonna (güzelavrat otu)'nın özütünün nasıl anestetik olarak kullanılacağını anlatmıştır. Ayrıca, Veratrum album (beyaz marulcuk) özütünün antiemetik olarak (mide bulantısına karşı) kullanılmasını tavsiye etmiş, zeytinyağının yara iyileşmesindeki faydalarını anlatmıştır. Roma'lı doktorlar bu kapsamlı bilgilerin üzerine yeni bilgiler eklemiş ve kendi bakış açılarını oluşturmuştur. Pedanius Dioskorides, yaklaşık 600 bitki türevli ilacın dozunu ve etkisini açıklayan, Avrupa'da farmakolojinin temellerini attığı 'De Materia Medica'yı derlemiştir. Bir başka ünlü Yunan hekim ve eczacı Galen ise, 540 bitki türevli ilaç kaydetmiş ve bitkisel özlerin sadece yararlı bileşenleri değil, aynı zamanda zararlı maddeleri de içerdiğini göstermiştir (85).

Bitkilerden elde edilen ilk etken maddenin 1805'te Alman kimyacı Serturme tarafından afyon bitkisinden izole edilen morfin olduğu, bunu 1820'de kınakının kabuklarından kinin, 1868'de yüksük otu (Digitalin) yapraklarından kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan digitalin ve 1890'da söğüt dalı kabuğundan asetil salisilik asidin izolasyonu takip ettiği bilinir (86). Daha sonraları doğal ilaçların senteti türevleri sentezlenerek insanların hizmetine sunulmuştur. Sentetik olarak elde edilen ilaçların istenmeyen yan etkilerinin olması, insanları tekrar doğal kaynaklı ilaçları kullanmaya yönlendirmiştir. Bu amaçla yeni doğal ilaç ham maddeleri bulmak üzere bitkiler üzerinde yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır (87-90). Tedavi amacıyla kullanılan ve bilinen tıbbi bitki miktarının 20.000'e ulaştığı tahmin edilmektedir. Bunlardan 4.000 bitkisel ilaç yaygın bir şekilde kullanılırken, Avrupa'da 2.000 kadar bitkisel ilacın ticareti yapılmaktadır (91). Doğal ürün veri tabanlarında rapor edilen bileşiklerin sadece %41,4'ü biyolojik açıdan incelenmiştir (20).

Bitkiler, doğal ilaç hammadde kaynaklarının önemli bir bölümünü kapsamaktadırlar. Kanser tedavisinde klinik olarak iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan bitkilerden elde edilmiş bileşikler oldukça fazladır. Bu ilaçlar bitkilerin ham özleri veya onlardan izole edilmiş bileşiklerden üretilmiştir (23-29).

İn vitro yöntemler ilaç buluşlarının temel taşı olmaktadır. Şu ana kadar doğal kaynaklardan izole edilen birçok ürün, in vivo ve/veya in vitro koşullarda test edilmiştir. Ayrıca doğrudan bitkilerden elde edilen özütler de tedavide önemli bir yer tutmaktadır. Birçok modern ilaç, kimyasal yollar ile modifiye edilmiş bitkisel kaynaklı moleküllerden geliştirilmektedir. Tam sentetik ilaçların yaklaşık yarısı, doğal bir ürünün aktif parçasını taklit eden, doğal ürünlerin analogları olarak üretilmektedir. Doğal bitkiler veya taklit ürünler, anti-kanser ilaçlar veya kanser kemopreventif, nutrasötikler, kozmesötikler olarak etkilere sahip olabilirler (32). Kimyasal ilaçların yapımında büyük bir gelişme olmasına rağmen gelişmiş ülkelerde kanser tedavisi için yazılan reçeteli ilaçların %75'ini bitkisel kökenli etken maddeleri olan vinblastin, rezerpin, kinin, asetil salisilik asit (aspirin) gibi ilaçlar oluşturmaktadır (17).

2.7.2. Kanser Tedavisinde Doğal Ürünlerin Kullanımı

Günümüzde anti-tümörojenik ve apoptotik etkisi kanıtlanmış birçok bitkisel kökenli bileşik tanımlanmıştır (30-32).

Bitki kökenli anti-kanser ajanlar ile ilgili ilk çalışma Robert Noble ve Charles Thomas Beer tarafından, *Vinca rosea* olarak da bilinen *Catharanthus roseus*'tan elde edilen vinka alkaloidler, vinblastin ve vinkristin üzerinde 1950'lerde gerçekleştirilmiştir (92). Günümüzde klinik kullanımda bulunan çoğu kanser kemoterapi maddeleri ya bitki kökenli ya da bitkisel kaynaklı bileşiklerin analoglarından elde edilmektedir. Örneğin, prostat kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapik ilaç sınıfından olan "Docetaxel", *Taxus baccata* L.'den (Adi Porsuk Ağacı) özütleme yöntemiyle elde edilmektedir ve D vitamini ile birlikte kemoterapide kullanılan doğal ürünlerdendir. Ginseng'in, kanserde anjiyogenezi ve ilaç direncini engellediği, tümör hücrelerinin tanınmasını arttırdığı, çeşitli kanser hücreleri üzerinde sitotoksik olduğu gösterilmiştir (93). 1967 yılında (Monroe E. Wall ve Mansukh C. Wani) antimitotik etkiye sahip bileşik olarak *Taxus brevifolia* bitkisinin kabuğunda simbiyotik yaşayan bir mantarın sentezlediği antimitotik taksol izole edilmiştir. Taksol günümüzde akciğer, rahim ve meme kanseri olmak üzere pekçok kanser türünün tedavisinde kullanılmaktadır (94).

Bitkisel ürünler, sentetik ilaçlara göre daha az yan etkiye sahip olmalarına rağmen, toksisitelerinden tam olarak arınmış değildir (95). Çeşitli bitkilerden elde edilen

kimyasalların yapısal çeşitliliği, duyarlı ve dirençli fenotiplere sahip farklı kanser hücre tiplerinin ayırılmasında potansiyel bir öneme sahiptir. Bitkisel ürünlerin antikanser biyoaktivitelerinin tespiti için bitkilerin farklı kısımlarından (kök, gövde, yaprak, çiçek veya tohum gibi) özütler hazırlanarak öncelikle bitkinin sitotoksik etkisi araştırılmakta, daha sonra bitkilerin bileşikleri izole edilip etken maddeler tayin edilmektedir (96).

Anti-kanser ilaçların birçoğu doğal ürünlerin taklitleri olarak üretilir ve bu ürünler ikincil metabolitler olarak tanımlanır. Yüksek bitkilerden elde edilen doğal bileşiklerin veya ikincil metabolitlerin tümörögenез üzerindeki etkileri in vitro'da kanser hücreleri üzerinde veya in vivo'da deneysel tümör modeli oluşturulan hayvanlar üzerinde araştırılmaktadır (32).

Birçok geleneksel anti-kanser ajanların birincil sitotoksik etki mekanizması DNA hasarı ve apoptozun uyarılmasına dayanmaktadır. Kanser hücreleri, sitotoksik reaksiyonlara hücre döngüsü engellenmesi veya gecikmesi ile de cevap verebilir. Kemoterapötik maddelerin hızlı bölünen normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi ve bölünmeyi durdurmaları nedeniyle saç dökülmesi, bitkinlik, enfeksiyon vb. gibi yaygın yan etkiler görülebilir (28).

Bitkisel kökenli anti-kanser ilaçlardan az sayıda ajan klinik olarak kullanılmak üzere FDA (Food and Drug Administration- Gıda ve İlaç Dairesi)'dan onay almıştır. Bunlar için prostat tümörlerinde kullanılan finasterid ve meme tümörlerinde kullanılan tamoksifen örnek verilebilir. Birçok ikincil bitki metabolitlerinin in vitro ve hayvan deneylerinde kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasını engellediği, transforme hücrelerin apoptotik potansiyelini arttırdığı ve tümör hücrelerinin proanjyogenik/metastatik potansiyelini düzenleme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir Bunlardan kemoterapide geniş çapta kullanılan paklitaksel, vinblastin, vinkristin, etoposid'e ek olarak son zamanlarda artemisinin, kannabioid, resveratrol, kamptoteşin gibi bazı bileşikler klinik denemelerde kullanılmaya başlamıştır (32).

Bitkiler, ilaç tedavisi ve diğer uygulamalarda potansiyel bir kullanıma sahip olan yeni kimyasal bileşiklerin kaynağını oluşturmaktadır. Bitkiler; alkaloidler, steroidler, taninler, glikosidler, uçucu yağlar, sabit yağlar, reçineler, fenoller ve flavonoidler gibi bileşikleri yaprak, çiçek, ağaç kabuğu, tohum, meyve, kök gibi özel bölgelerde biriken birçok aktif bileşik içermektedirler. Bitki materyallerinin tedavi edici etkileri bu ikincil ürünlerin kombinasyonu ile ortaya çıkarılmaktadır (97).

2.7.3. Toros Sediri (*Cedrus libani* A. Rich)

Toros sediri (*Cedrus libani* A. Rich.) Gymnospermae'lerin Coniferae sınıfı Pinoideae takımını Pinaceae familyasındandır. Boyları 40 metreye, çapı 2 metreye ve 35 mm kabuk kalınlığına erişebilen Toros sediri dolgun gövdeli, kalın dallı ve 1000 yaşına kadar yaşayabilen ihtişamlı bir orman ağacıdır (135,136).

Dört cins sedir türü bulunmaktadır;

Himalaya Sediri (*Cedrus deodara* Loud): Afganistan, Nepal ve Batı Himalaya Dağlarında yayılış gösterir.

Atlas Sediri (*Cedrus atlantica* Manetti): Kuzey Afrika'nın Atlas dağlarında yayılış gösterir.

Kıbrıs Sediri (*Cedrus brevifolia* Henry): Kıbrıs'ın güney doğu bölgesinde endemik bir tür olarak yayılış gösterir.

Toros Sediri (*Cedrus libani* A. Rich): Güney Anadolu'da, Toros dağlarında ve Lübnan'da yayılış göstermektedir.

Sedir Toroslarda 1000-2000 metre rakımlar arasında yayılış göstermektedir. Toros sedirinin yayılışını yaptığı bu alanda kışları çok sert geçmektedir. Sedir kışın zor şartlarına ve yazın oluşan aşırı sıcaklıklarına oldukça toleranslı bir türdür. Sedirin kış şartlarına ve yaz aşırı sıcaklığına dayanıklı ve uyum yeteneğinin yüksek bir tür olmasından dolayı ağaçlandırma çalışmalarında çok sık tercih edilmektedir (137).



Şekil 2.2. Cedrus Libani Kozalağı ve Yaprağı

2.7.4. Doğal Ürünlerden Özüt Hazırlama Yöntemleri

Çeşitli kanser hücre soylarında sitotoksik veya anti-kanser aktiviteye sahip bitki kökenli ürünlerin potansiyel etkilerini belirleyebilmek amacıyla, bitki özütleri (ekstre) farklı şekillerde hazırlanmaktadır. Özütleme (ekstraksiyon), standart işlemler ile seçici çözücüler kullanılarak bitki ya da hayvan dokularındaki inaktif bileşenlerden aktif bileşenleri ayırmak için kullanılan bir yöntemdir (98). Özütleme, doğal bileşiklerden ilaç formülasyonlarının hazırlanmasındaki ilk önemli adımdır. Modern özütleme yöntemleri, geleneksel bitkisel ilaçların gelişiminde oldukça etkilidir.

Bir bitki materyalinin özütlenmesi ve bileşiklerinin izole edilmesi aşağıdaki temel aşamaları kapsar (31).

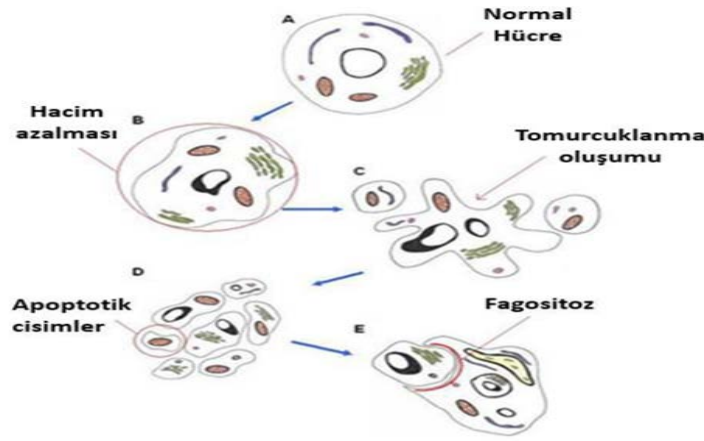
1. Toplama ve bitki materyalinin doğruluğunu kanıtlama
2. Kurutma
3. Boyut küçültme
4. Ekstraksiyon
5. Filtrasyon
6. Konsantrasyon
7. Kurutma ve sulandırma

Çeşitli bitkisel özütlerin farklı hazırlanış şekillerine göre (suda, etanolde, metanolde, kloroformda, heksanda, diklorometanda) farklı kanser hücre soylarında farklı etkilere sahip olduklarını gösteren çok sayıda çalışma vardır. Örneğin, Arizona kaktüsünün (*Opuntia ficus-indica*) meyvesi olan kaktüs armudunun sulu özütünün HeLa hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu, kaktüs armudunun %1'lik solüsyonunun HeLa hücrelerinin %40-60'ını öldürdüğü, %5'lik solüsyonunun ise 5. günde hücrelerin tamamını öldürdüğü gösterilmiştir (99).

2.8. Apoptoz

Apoptoz (programlı hücre ölümü), hücre proliferasyonunun kontrolü için veya DNA hasarına yanıt olarak hücrelerin seçtiği fizyolojik bir ölüm şeklidir. Embriyogenez, morfogenez, normal doku yenilenmesi gibi fizyolojik olaylar sırasında ya da çeşitli patolojik koşullarda hücre içi veya hücre dışı uyaranlar tetiklenebilmektedir.

Apoptozun tipik morfolojik özellikleri; hücre büzülmesi, hücre membranının tomurcuklanması, kromatin kondensasyonu ve nukleus parçalanmasıdır (Şekil 2). Apoptozun erken evrelerinde hücre yüzeyinde birtakım değişiklikler ortaya çıkar. Plazma membranının iç yüzünde yer alan Fosfatidilserin (PS) membran dışına taşınır. Makrofajlar veya komşu hücreler, apoptotik hücreleri yüzeydeki bu molekülleri tanıyarak fagositoz ile yutarak ortadan kaldırırlar. Bu temizlik süreci organizmaların gelişimi ve homeostasisi için önemlidir. Annexin-V, fosfatidilserin'e bağlanan rekombinant bir protein olup, PS uçlarıyla güçlü bir şekilde etkileşir ve apoptozun tespitinde kullanılabilir. Apoptotik hücrenin bu şekilde yok edilmesi inflamasyon oluşumunu engeller. Bu işlem sonucunda veya sırasında oluşabilecek herhangi bir hata veya yetmezlik sonucunda çeşitli hastalıklar ortaya çıkabilir (10-104,65,105).



Şekil 2.3. Apoptoz Morfolojisi

2.9. Kanser ve Apoptoz

Yetişkin insan vücudunda her saniye mitoz ile yüzbinlerce yeni hücre oluşurken, homeostasinin sağlanması adına bir o kadarı da apoptoz ile ölmektedir. Apoptotik sinyallerdeki bozukluk çeşitli hastalıklarda birinci veya ikinci düzeyde rol oynayabilir.

Kanser, normal bir hücreyi malign bir hale çeviren değişiklikler/mutasyonlar nedeniyle, hücrelerin sayısının aşırı artmasına, apoptozun azalmasına veya apoptoza direnç gösterilmesine neden olan bir hastalıktır. Bcl-2 ailesine ait proteinlerin anormal çalışması kanserde sıklıkla görülmektedir. Bcl-2 birçok kanser türünde aşırı ifade edilmekte ve apoptozun doğrudan baskılanmasına yol açarak kanserin gelişimine neden

olmaktadır. Bcl-2 proteinin aşırı şekilde ifade edilmesi hematopoetik hastalıklarda sıklıkla görülmektedir.

Moleküler mekanizmaları hızlıca çözülen apoptotik hücre ölümünün engellenmesi veya uyarılmasına yönelik yeni teşhis ve tedavi modelleri geliştirilmektedir. Proapoptotik veya antiapoptotik genlerin mutasyonları ile veya bu moleküllerin yokluğu ya da aşırı ifadeleri ile apoptoz mekanizmasının bozulabildiği ve çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynadığı birçok çalışma ile gösterilmiştir. Apoptoz yollarını gen tedavisi, antisens stratejiler, rekombinant bileşikler, klasik organik kimyasallar kullanarak engellenerek veya uyarılarak tedavi amacıyla birçok deneysel ve klinik çalışmalar yapılmaktadır. Kanser tedavisinde çok sayıda geliştirilmiş ve piyasa sürülmüş olan apoptoz ile ilişkili ilaçlar bulunmaktadır.

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların birçoğu, apoptozu kontrol eden genlerin ekspresyonları üzerine etkilidirler. Deneysel modeller ile hücre ölüm reseptörlerine agonist veya antagonist rekombinant moleküller ile ölüm reseptörlerinin işlevlerinin baskılandığı veya uyarıldığı gösterilmiştir. TRAIL agonistleri ile kanser ve diğer bazı hastalıkların tedavisinde klinik çalışmalar hızla devam etmektedir. Meme epitelinde Bcl-2 ekspresyonu östrojene bağımlıdır ve anti-östrojen etkili tamoksifen'in kullanımı ile meme kanserlerinde Bcl-2 ekspresyonları baskılanır ve apoptoz uyarılır. Bir diğer ajan olan vitamin D ve sentetik analogları, vitamin D reseptörlerini uyarır ve çoğu antiapoptotik Bcl-2 ailesine ait genin, örneğin Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1'in ekspresyonunu baskılar (106,61,104,65,107).

2.10. Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite

Sitotoksosite, ölüm mekanizmalarından bağımsız kimyasal bir bileşiğin hücre öldürme özelliği olarak tanımlanır. Sitotoksosite testi, etken bir maddenin kanser hücreleri üzerindeki toksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan bir yöntemdir. Geleneksel tedavi modelleri içinde yer alan sitotoksik kemoterapi, hala birçok kanser türü için tercih edilmektedir (55). Kemoterapi amaçlı kullanılmakta olan sitotoksik maddeler, bölünme evresindeki bir hücreyi, G0 fazındaki bir hücreye oranla daha fazla etkilemektedir. Bu nedenle, sitotoksik etkinin saptanması büyük önem taşımaktadır. Potansiyel antikanser

bileşikler için yapılan tarama çalışmalarında sitotoksosite mümkün olan en düşük konsantrasyonda taranmalıdır (59,60).

Sitotoksik etki, tümör hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde büyümesini önlemek amacıyla antikanser tedavilerde tercih edilir. Kullanılan sitotoksik ilaçlar, hücre çoğalmasının kontrolünde rol oynayan kinazlar, membran reseptörleri veya hücre içi sinyal moleküllerinin işlevlerine müdahale eder. Bu nedenle sitotoksik bir etki, hücre ölümünün uyarılmasından önce hücre büyümesi ve bölünmesini engelleyerek durdurmaktadır (108).

Hücre canlılığının ölçümü, hücre biyolojisinde temel adımdır. Sitotoksitenin saptanmasında çeşitli analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Klasik olarak Tripan mavisi testi, LDH testi, Nötral kırmızı testi, MTT, MTS, WST-1, XTT testleri gibi hücre canlılığını ve sitotoksisiteyi tespit etmekte kullanılan birçok yöntem vardır. Bu yöntemlerin yanı sıra son yıllarda hassas analizler yapabilen sistemler geliştirilmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

Tez önerisi sunulmadan önce bir literatür araştırması yapıldı. Bunun neticesinde çalışma devamında. Antikanser özellik tespiti için yapılacak çalışmaları şu şekilde sıralayabiliriz.

- 1- Elde edilen katran ekstresinin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT yöntemiyle tespit edilecek.
- 2- Sitotoksik etkinliği tespit edilen ekstrerin, IC50 konsantrasyonları kullanılarak, gösterilen sitotoksik etkinin apoptotik olup olmadığı; flow sitometrik Annexin V yöntemiyle, cell cycle analizi, intracellular ROS etkisi ve morfolojik olarak da Acridine orange /Ethidium bromide ve Annexin-V fluoressan boyama yöntemleri ile tespit edilecek.

3.1. Katran Ekstrelerinin Hazırlanması

Bu çalışmada yapımını detaylı bir şekilde belirttikleri, toros dağ köylerinde geleneksel yöntemlerle elde edilmiş katran kullanılacak (117).

3.2. Materyal

- Sınıf II güvenlik kabini (Thermo)
- CO2'li inkübatör (Thermo)
- İnvörted ışık mikroskobu (Olympus CKX 41)
- Flouresans mikroskop ve görüntüleme sistemi (Olympus CKX 51, DP73)
- Flow sitometri (BD facs via)
- Mikroplayt reader (Spectramax M5, Thermo supergo)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich R 320)
- pH metre (Toledo)
- 75 cm'lik hücre kültür kapları
- 25 cm'lik hücre kültür kapları
- 96 kuyucuklu hücre kültür kapları (Corning)
- 6 kuyucuklu hücre kültür kapları (Corning)
- 12 kuyucuklu hücre kültür kapları (Corning)

- 5- 10 ml hacimli steril pipetler (Corning)
- 10, 100, 200, 1 000 µl' lik otomatik pipetler (Eppendorf)
- Cam pastör pipetleri
- 15 ve 50 ml' lik falkon tüp (Corning)
- Eppendorf tüpler
- Tripsin-EDTA (Gibco)
- DMSO (Sigma)
- Hücre ortamı; DMEM F-12 (Sigma)
- Fötal bovine serumu (FBS) (Gibco)
- Penisilin/streptomisin (Sigma)
- L- Glutamin (Sigma)
- %0.4 Tripan mavisi solüsyonu (Sigma)
- Thoma lamı
- Fosfat tamponu (PBS/Phosphate Buffered Saline)
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
- Acridine orange /Ethidium bromide
- Annexin V kiti (BD)
- JC-1 kiti (Abcam red)
- ROS kiti (Sigma)

Bu tez çalışmasında deneyler için sıvı azotta sakladığımız normal ve kanserli hücre hatları kullanıldı.

- HCT-116 (insan kolon karsinom hücre hattı)
- HUVEC (normal insan embriyonel hücre hattı)

3.2.1. Hücrelerin Hazırlanması

Hücreleri büyütmek ve besin gereksinimlerini karşılamak için %10 FBS, % 1 penisilinli/streptomisinli, % 1 L-glutaminli içeren DMEM F-12 besin ortamı kullanıldı. Yüzeyle bağımlı hücreler büyütülürken hücreler yüzeyi tamamen kaplayıncaya kadar rutin olarak 2 günde bir ortamları steril cam pastör pipeti yardımı ile çekildi ve ardından hücrelerin üzerine taze besin ortamı eklenerek hücrelerin ortamı değiştirildi. Hücreler, 75 cm³ hücre kültürü kaplarında 37°C' de %5 CO₂' li inkübatörde büyütüldü.

3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması

Büyütülen hücreler tüm yüzeyi kaplayacak kadar çoğaldıkları zaman hücrelerin üzerlerindeki besi ortamı steril pastör pipetleri ile çekilerek atıldı. Ardından hücre kültürünün yüzeyi tripsin-edta muamelesinin etkisini arttırmak amacı ile Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen ticari olarak satılan steril 1X PBS ile muamele edilerek hücreler 1 kere yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı. Hücre kültürünün üzerine tripsin-edta eklendi ve hücrelerin birbirlerinden ve plate yüzeyinden ayrılması beklendi. Ardından 1200 rpm de +4°C' de santrifüj edildi. Çöken hücrelerin üzerine %95 besi yeri ve %5 DMSO içerecek şekilde hazırlanan hücre dondurma solüsyonu eklendi ve hücreler bu solüsyon içerisinde önce -200C'lik derin dondurucuda veya -86°C'lik derin dondurucuda kısa süreli saklanırken uzun süreli olarak sıvı azota alınarak saklandı.

3.2.3. Katran Ekstrelerinin Uygulanması ve Sitotoksik Etkilerinin Saptanması

3.2.4 Hücre Sayımı

Hücrelerden yeni kültüre etmek için istenen miktarda hücre almak amacıyla thoma lamı hücre sayımı yapıldı. Sayım için hücrelerin bulunduğu süspansiyonundan 10 µl alınırken tripan mavisinden 90 µl alındı ve böylece karışımı 100 µl' ye tamamlandı. Hemositometrenin üzerine bir lamel koyuldu ve homojenize edilen hücreler boya karışımından pipet yardımıyla thoma lamı ve lamel arasına kenardan yavaşça aktarıldı. Thoma lamı üzerinde yer alan 9 büyük kare içindeki hücreler sayıldı. Milimetredeki hücre sayısını (hücre sayısı/ml) belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanıldı.

$$\text{Hücre sayısı/ml} = ((\text{Sayılan hücre miktarı} \times \text{Dilüsyon oranı (10)}) \times 104) / 8.$$

Büyütülen hücreler %80-90 oranında çoğalınca, tripsinizasyon ile kaldırılıp 1x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril pleytlere ekildi. 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından besi yerleri uzaklaştırıldı ve yerine 0-2,5-5-10-25-50-100-200 µg/ml konsantrasyonlarında katran ekstresi içeren 200 µl besiyeri hücrelere eklenerek 24 saat %5 CO₂'li atmosferde 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

3.3. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

MTT hücre proliferasyon kiti kullanılarak katran ekstresi sitotoksik etkileri incelenecek. MTT testi canlı hücrelerdeki metabolik aktiviteyi, hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi aracılığı ile MTT parçalayarak, çözülebilir formazan tuzları oluşturmasını prensibine dayanarak yapılmaktadır. Hücreler stoktan açılarak 25 cm³ flasklara ekilip, %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekilecek. 24 saatlik süre ardından besi yerleri uzaklaştırılıp ve her bir ekstre için 0, 2.5, 5,10,25,50,100 ve 200 µg/ml olacak şekilde uygulanır ve sitotoksik doz bulunmaya çalışılır. Katran ekstresi her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde eklenir ve ardından 24 saatlik inkübasyon süresince %5 CO₂'li atmosferde 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki besi yerleri çekilip 20 µl serumsuz besi yeri üzerine 90 µl MTT solüsyonu eklenir ve ortalama 4 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda plaklardaki besiyeri uzaklaştırılır, formazon kristalleri 100 µl DMSO ile çözdürüldükten sonra absorbans değerleri spektrofotometrede 470 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedilir.

3.4. Apoptotik Etkinin Tespit Edilmesi

3.4.1. Apoptotik Etkisinin Annexin-V ile Flow Sitometrik İncelenmesi

Katran yağının yüksek sitotoksik etki gösterdiği kanser hücresi üzerindeki sitotoksik etkilerinin apoptotik yolağın aktiflenerek mi yoksa hücrelerde nekrozis mi olduğu Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC kit protokolü uygulandıktan sonra flow sitometri (BD FACS Canto) ile analiz edilecek. Annexin-V apoptoz analizinde kullanılan FITC ile konjüge Annexin-V lektini, apoptotik hücrelerin hücre membranının dış yüzeyinde bulunan fosfatidil serin fosfolipidine bağlanır. FITC, Annexin-V bağlanan hücrelerin flüoresan (FL1 detektörü; eksitasyon= 488nm, emisyon=535nm) ışımaya neden olmaktadır. Hücrelerdeki bu flüoresan ışımaya akış sitometrideki FL1 detektörü ile belirlenebilir. Işımanın şiddetine göre hücreler sınıflandırılır ve bir diyagrama yerleştirilir. Ölü (mekrotik) hücreler ise nükleik asitlere bağlanabilen flüoresan PI (FL2 detektörü, eksitasyon= 488nm, emisyon=562-588nm) boyası ile belirlenir. PI nekrotik

hücrelerin zarar görmüş hücre membranından geçerek DNA'larını boyar. DNA'ları boyanan hücrelerdeki flüoresan ışımaya akış sitometrideki FL2 dedektörü ile belirlenir. Işımanın şiddetine göre hücreler sınıflandırılır ve bir diyagrama yerleştirilir.

Yüksek sitotoksik etki gösteren katran ekstraktlarının; olası sitotoksik etkilerinin apoptotik yolağın aktiflenerek mi yoksa hücrelerde nekrozisle mi olduğu Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC kit protokolü uygulandıktan sonra flow sitometri (BD FACS Canto) ile analiz edildi.

3.4.2. Acridine Orange /Ethidium Bromide Staining Metodu İle Apoptozisin Morfolojik Olarak Tespit Edilmesi

Katran ekstresi ile muamele edilmiş hücre lamelleri alınıp, 2 kez 2 dakika PBS ile yıkanır. 5 dakika %70 etanol ile fikse edilip, hücreler 5 defa distile su ile yıkanır. Daha sonra bunlar 2 kez PBS'de bekletilip oda ısısında 15 dakika akridin orange/Ethidium bromide çalısma solüsyonu ile boyanır. Lamellerin kurutma kâğıdı üzerinde dik tutulması suretiyle boya uzaklaştırılır ve 4 kez PBS ile yıkanır. Lamellere bir damla PBS damlatılıp lamaların üzeri kapatılarak floresans mikroskopta incelenir.

3.4.3. Cell Cycle (Hücre Döngüsü) Kiti ile Apoptotik Etkinin İncelenmesi

Hücre döngüsü için BD Cycletest™ Plus DNA Reagent kiti (biosciences, Almanya) kullanıldı.

Kitin çalışma prosedörü aşağıdaki gibidir:

1. Hücreler 1.000.000 olacak şekilde sayıldı.
2. 12'lik well plate ekilmiş olan hücrelerin üzerine 300 ul tripsin, 1ml fcsli dmem ile kaldırıldı.
3. Plateden kaldırılan hücreler 5000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi, pellete dokunmadan süpernatant uzaklaştırıldı.
4. Hücre süspansiyonlarının üzerine buffer solution eklendi. (1ml buffer solution + 9 ml destile su ile seyreltildi) 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılarak, bu işlem iki defa tekrarlandı.

5. Hücre süspansiyonunun üzerine 250 µl solution A (tripsin buffer) eklendi. Tüplerin dibine hafifçe vurularak karışması sağlandı. (vorteks kullanılmadı).10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
6. Hücre süspansiyonunun üzerine 200 µl solution B (tripsin inhibitor ve RNase buffer) eklendi. Yine tüplerin dibine hafifçe vurularak karıştırılması sağlandı.10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
7. Hücre süspansiyonunun üzerine 200 µl solution (DNA ya bağlanan boya) eklenip ve yine tüplerin dibine hafifçe vurularak karıştırılması sağlandı ve 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
8. Hücre süspansiyonları daha sonra BD FACS VİA tipi akım (flow) sitometre ile değerlendirilip, kaluza analysis programı kullanılarak her numune için hücreler sayılıp analiz edildi.

3.5. Hücre İçi Serbest Radikal Değişimi Analizi (ROS)

Reaktif oksijen türleri (ROS), normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH)' dir.

Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin olduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R), peroksit radikalleri (ROO), alkoksi radikalleri (RO), tiyil radikalleri (RS), sülfenil radikalleri (RSO), tiyil peroksit radikalleri (RSO_2) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar.Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. İskemi sonrasında reperfüzyon da reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına bağlı olarak iskeminin oluşturduğu hücre hasarını artırır.

Hücre içi serbest radikal ölçümü Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (Red Fluorescence, abcam, 186027) kiti kullanılarak yapıldı. Bu kitte, hücreye geçirgen olan bir floresans prop kullanılır. Bu prop ROS ile reaksiyona girdiğinde kırmızı flüoresan oluşturur.Kit protokolü şu şekilde uygulandı. Siyah pleytlere 100 µl'de 3×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılarak 24 saat inkübe edildi. PBS içerisinde katran bileşikleri IC50 dozlarında uygulanacak. İnkübatörde $37^\circ C$ 'de %5 CO_2 1 saat inkübe edildi (ışıktan korunarak) Bileşikler döküldükten sonra kuyucuklara 100 µl' ROS Deep

Red Working Solution eklenip 37°C'de %5 CO₂ 1 saat inkübe edildi. Fluorimetri cihazında (Spektramax M5) Ex/Em = 650/675 nm (cut off = 665 nm) ölçüm yapıldı.

3.6. Mitokondriyal Membran Potansiyeli (JC-1) Ölçümü

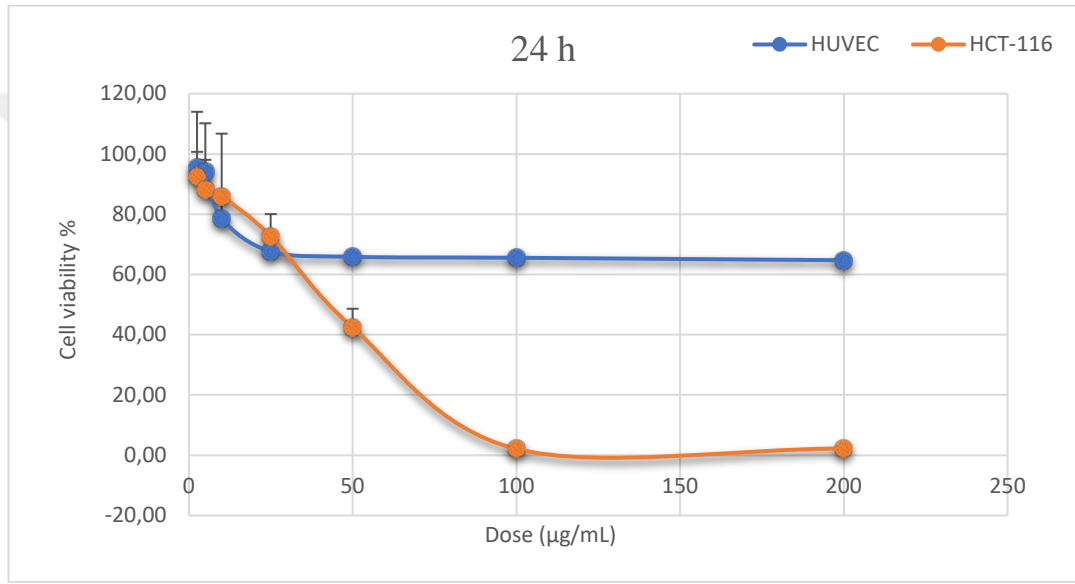
Çalışmamızda, apoptozun mitokondriyal iç yolağında ortaya çıkan mitokondriyal membran potansiyel değişimi spektrofotometrik olarak belirlendi. Mitokondriyal Membran Potansiyeli (JC-1) ölçümü Fluorometric JC-1 Kit (Sigma MAK 150) protokolüne göre yapıldı. JC-1 Stok solüsyonu (1 mg/ml) aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

- 200µl DMSO liyofilize olan JC-1 boyası üzerine eklendi. Tüpün ağzı parafilm ile kapatılarak vorteks ile karıştırıldı.
- 15 dk oda sıcaklığında bekletilerek tamamen çözüldü.
- 200µl'de çözünen JC-1 boyası orjinal DMSO tüpüne transfer edildi ve çözülmesi beklendi.
- 25 µl hazırlanan stok solüsyonundan alınarak 4ml ultrasaf su içerisinde çözüldü ve karıştırıldı.
- 1-2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Aynı tüp içerisine 1ml 5X staining buffer eklendi.
- Eşit miktarda büyüme mediumu (5ml-5ml) ile karıştırılarak boyama karışımı elde edildi.
- Hücreler (0.2–1.2 x 10⁶ cells/ml) üzerindeki büyüme mediumu çekildi ve üzerine 200-400µl arasında hazırlanan boyama karışımından eklendi.
- 37°C'de %5 CO₂ 20dk inkübe edildi.
- Boyama karışımı uzaklaştırılarak 2 defa büyüme mediumu ile yıkandı.
- Büyüme mediumu ile hücreler kaplanarak 490 nm(excitation) 530 nm(emission) florimetri (Spektramax M5) cihazında ölçüldü.

4. BULGULAR

4.1. Katran Ektresinin Sitotoksik Etkileri

Katran bitkisi ile hazırlanan fraksiyonunun kolon kanser (HCT-116) ve normal sağlıklı insan hücreleri (HUVEC) üzerine etkisi MTT Assay yöntemi kullanılarak tespit edildi. 24 saat sonunda kolon kanseri üzerinde sitotoksik etkisi (IC50) 30 µg/mL olarak hesaplanırken, normal hücreler üzerindeki etkisinin ise yaklaşık iki kat daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.1).



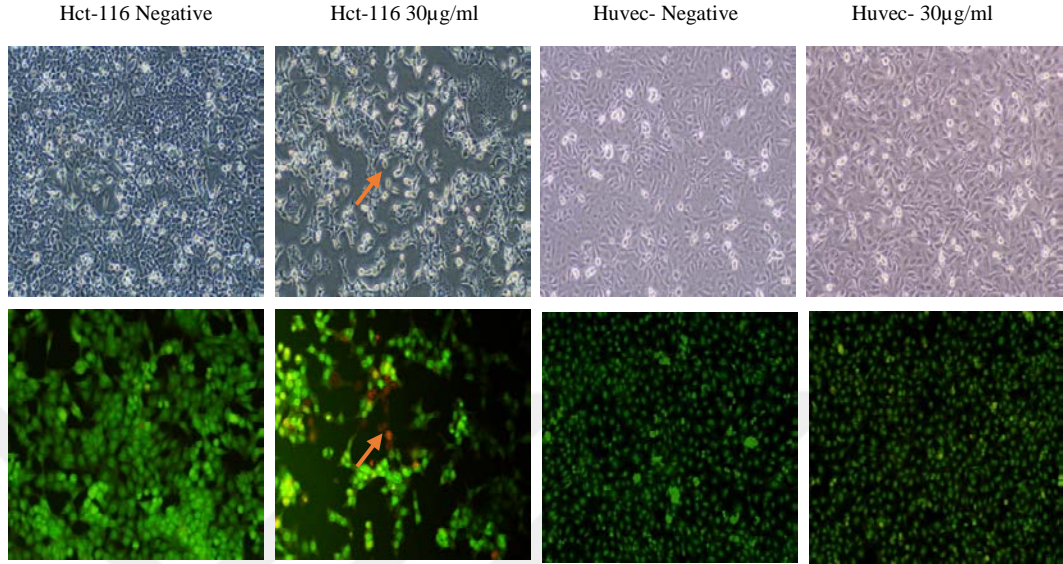
Şekil 4.1. Katran Ektresinin Hct-116 ve Huvec Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Sonucu

4.2. Acridine Orange /Ethidium Bromide Staining Analizi

Acridin orange metodunda hücre çekirdeğinde ve hücre membranında meydana gelen apoptoz kaynaklı olarak gerçekleşen değişiklikleri belirlemek ve incelemektir. Ethidium bromide membran bütünlüğü bozulmuş hücreleri boyarken acridin orange boyası canlı ve ölü hücreleri boyamaktadır. Hücre bütünlüğü ve aktivitesi devam eden hücreler yeşil renk boyanırken apoptotik hücreler sarı turuncu renk almaktadır. Ölen hücreler ise kırmızı renk boyanmaktadır.

Hücre ölümündeki morfolojik değişiklikleri gözlemlemek için AO / EB boyama yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Katran ile muamele edilen HUVEC ve HCT-116

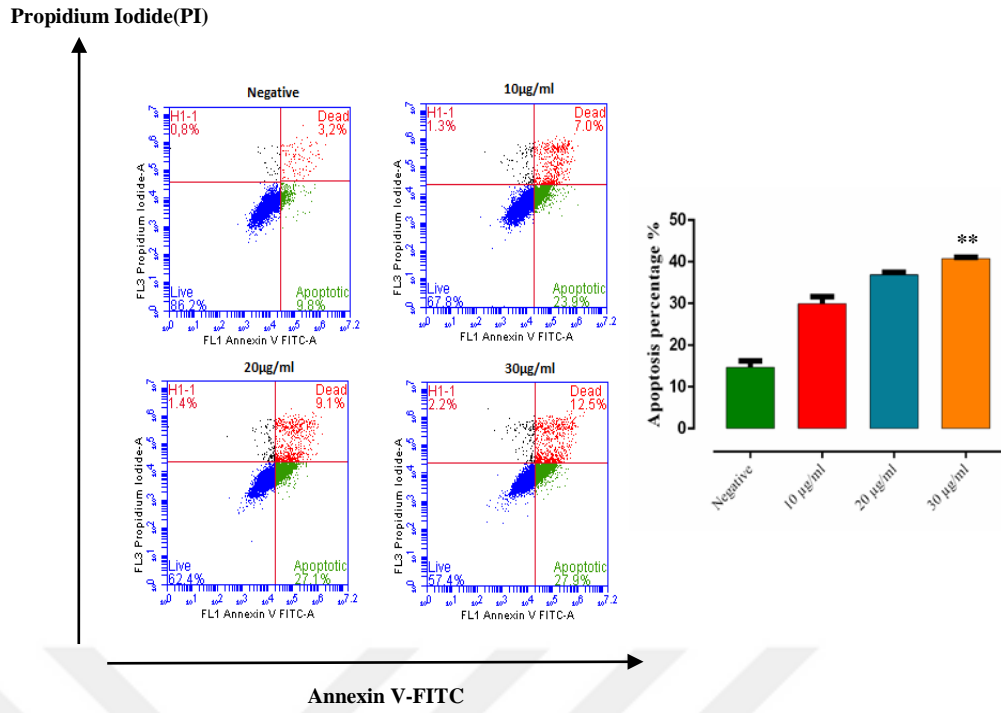
hücrelerinde meydana gelen morfoloji değişimi apoptozisin tetiklendiğini gösterdi. Şekil 4.2' de görüldüğü gibi yeşil renkli olan hücreler sağlıklı, sarı-kırmızı renk değişimi gözlenenler ise apoptotik hücreler olarak değerlendirildi.



Şekil 4.2. HCT- 116 ve HUVEC Hücrelerinin AO /EB ve Morfoloji Görüntüleri

4.3. Flow Sitometrik Annexin-V- PI Apoptoz/Nekroz Analizi

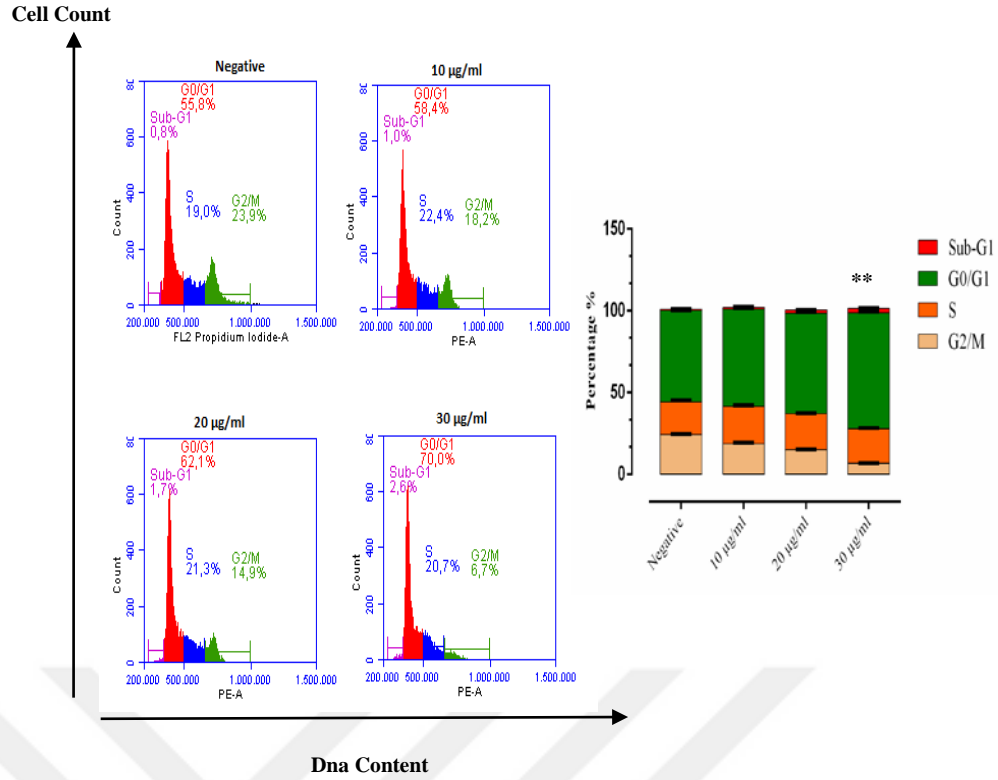
Hücre canlılığı ve proliferasyon deneyleri ile tespit edilen IC50 değerlerine göre 10, 20 ve 30µg/ml dozlarında HCT-116 hücreleri 24 saat inkübe edildi. Sonrasında hücre ölümünün çoğunluklu olarak apoptotik hücre ölümü olup olmadığı Akış Sitometrik Annexin-V-PI boyamaları ile tespit edildi. Şekil 4' de görüldüğü gibi 30 µg/ml dozlarında anlamlı bir etki gösterdiğini ve ölüm oranını %40,4 olarak tespit ettik ($p<0.05^*$, $p<0.001^{**}$, $p<0.0001^{***}$).



Şekil 4.3. HCT-116 Hücresinin Annexin-V Analiz Sonuçları

4.4. Flow Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi

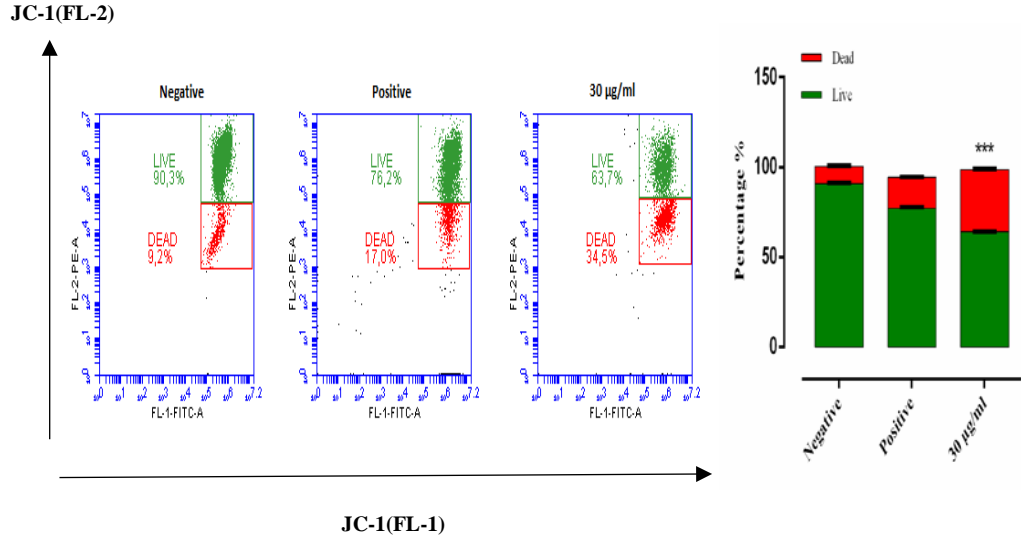
Bitki ekstraktı ile muamele edilen HCT-116 hücrelerin bölünmesi üzerinde etkisi 10 µg/ml dozundan başlayarak görüldü ve bu etki artan dozun etkisiyle hücre bölünmesini yavaşlattığı tespit edildi. 30 µg/ml dozda, hücre döngüsü aşamaları Sub-G1'de %2.6, G0/G1 fazında %70.0, S fazında % 20.7 ve G2/M fazında % 6.7 olarak belirlendi. 10 µg/ml dozu ile kontrol grubu ve hücresi kıyaslandığında bitki ekstraktı ile muamele sonrası Sub-G1 fazında (kontrol grup %0.8-etkin doz %2.6) hücrelerin durdurulduğu gözlemlendi ($p < 0.05^*$, $p < 0.001^{**}$, $p < 0.0001^{***}$ Şekil. 7).



Şekil 4.4. Katran Ektresinin HCT-116 Hücre Döngüsü Grafiği

4.5. Flow Sitometrik Mitokondri Membran Potansiyeli (JC-1) Analizi

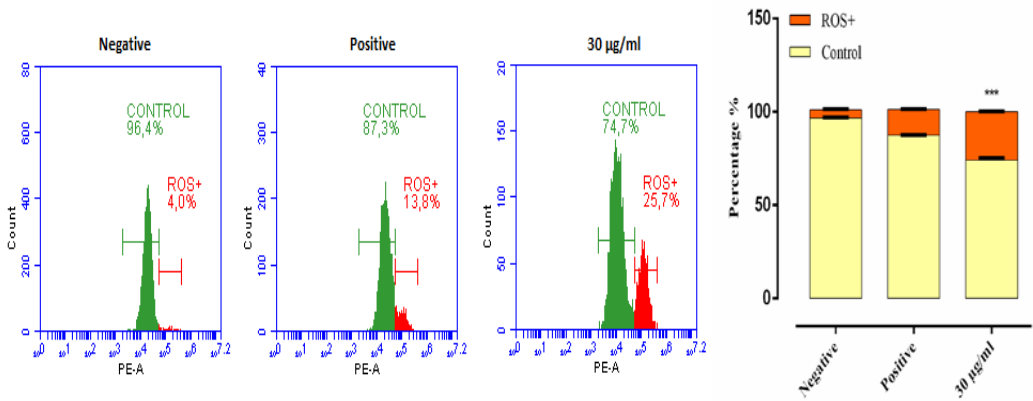
JC-1(5,5',6,6'-tetrachloro1,1',3,3'-tetra methyl benzimidazolyl carbocyanineiodide) mitondriyal membran potansiyelini analiz etmek için kullanılan bir boyadır. Mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması ile açılan porlardan aşırı miktarda reaktif oksijen türünün sitoplazmaya geçmesi apoptoz aktivasyonuna yol açar. Annexin V-FITC / PI'nın yanı sıra, katran bitkisinin apoptotik etkisini araştırmak için HCT-116 hücrelerini JC-1 boyaması yaptık; Şekil 8'de gösterildiği gibi, HCT-116 hücrelerinde apoptozun önemli ölçüde indüklendiği tespit edildi (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).



Şekil 4.5. Katran Ektesinin Apoptotik Etkinlik Grafiği

4.6. ROS (Hücre içi serbest radikal değişimi analizi)

Hücre içi serbest radikal değişimi analizi için hücreye geçirgen olan bir floresans prop kullanılır. Bu prop ROS ile reaksiyona girdiğinde kırmızı fluoerans oluşturur. Çalışmamızda, yeşil hekzan'ın hücre içi etkisi incelendiğinde negatif gruba göre doz artışına bağlı olarak ROS miktarında artış oluşturduğu tespit edilmiştir. (Figure 6.*p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001).Yanı sıra NRF-2 gen seviyesinde artış, hücre içi serbest radikal artışını doğrulamıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Katran Ektesinin Serbest Radikal Grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde kanser, sık görülmesi ve mortalite oranının yüksek olması sebebiyle önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Kardiyovasküler hastalıklardan sonra gelen ölümlerin birinci nedenidir. Kanser tedavisinde sıklıkla kemoterapi kullanılmaktadır. Kemoterapi yan etkileri ve kemoterapik yetersizlikleri kanserli hücreleri zarar verip öldürürken aynı zamanda sağlıklı vücut dokularına ve hücrelerine de zarar vermektedir. Kemoterapiden kaynaklı ek hastalıklar oluşmakta ve dahası kemoterapiden dolayı sağlıklı hücrelerin kanserleşmesi ve hastanın ölümü ile sonuçlanabilmektedir. Kemoterapinin yetersizlikleri ve kesin bir tedavi yöntemi olmamasından dolayı günümüzde kanser tedavisindeki araştırmalarında hedefe özgü yöntem ve tedavi teknikleri geliştirilmektedir. Bu amaçla bitkisel kökenli bileşikler kullanılmaktadır.

Bu çalışmamızda daha önce antikanser ve Sitotoksik etkisi incelenmeyen Toroslarda yetişen Sedir Ağacı'ndan (*Cedrus libani*) elde edilen katran ektresini 8 farklı konsantrasyonda HCT-116 (kolon adenokarsinom) ve HUVEC (normal insan hücre hattı) hücreleri soyları üzerinde apoptotik ve sitotoksik etkileri araştırıldı.

Anadolu yöresinde Toros sediri (*Cedrus libani*), Batı, Orta ve Doğu Toroslar'da doğal olarak, kuzeyde Erbaa ve Nixsar'da yayılış göstermektedir. Çoğunlukla yayılışı dikey sınırlarda 1000 ile 2000 metreler arasında olup, tek ağaç olarak 2400 metreye kadar çıkabilmektedir. 40 metreye kadar ulaşabilen boyları vardır.

Cedrus libani, Lübnan'da farklı enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için geleneksel tıp olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (138). Son zamanlarda *Cedrus libani*'nin koni ve yapraklarının antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu açıklanmıştır (139). *Cedrus libani*'nin konileri, *Helicobacter pylori* karşıtı aktivite için anti-ülserojenik etkiye sahiptir (140). Ayrıca Maymun böbrek hücre hattı (Vero) herpes simplex virüs tip-1 ile enfekte edip sedir bitkisinin uçucu yağları ve özütleri sitotoksik incelenmesi MTT ile yapıldı (138). Antiviral test herpes simplex virüs tip-1 (HSV-1) büyümesinin kısmen *Cedrus libani* tarafından inhibe edildiğini gösterdi (138). Ayrıca bazı çalışmalarda *Cedrus libani* antifungal etki gösterdiği de tespit edilmiştir (139). Cedir libani bitkisi ile daha önce insan kanserleri üzerinde herhangi bir araştırma yapılmamıştır.

Bu veriler doğrultusunda Antiviral, antimikrobiyal, antifungal ve hayvan hücre hatları üzerinde sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiş. Biz bu çalışmamızda Cedir libani bitkisinin katran ektresinin HCT-116 insan adenokarsinom ve HUVEC normal insan hücresi üzerindeki antikanser etkisini inceledik.

Katran bitkisi ile hazırlanan ektrenin kolon kanser (HCT-116) ve normal hücreleri (HUVEC) üzerine etkisi MTT Assay yöntemi kullanılarak tespit ettik. Bu ektre hücrelere sekiz farklı dozda (0 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml ve 200 µg/ml) uygulanıp 24 saat inkübasyonda bekletildi. 24 saatinin bitiminde kolon kanseri üzerindeki güçlü sitotoksik etki (IC50) 30 µg/ml gösterirken, normal hücreler üzerinde ise sitotoksik etki göstermemiştir.

Bu verileri doğrulamak amacıyla kolon kanseri üzerindeki sitotoksik etki (IC50) 30 µg/ml olan dozda hücrelerde apoptoza bağlı nükleüsta ve hücre çekirdeğindeki değişimleri Acridine Orange /Ethidium Bromide yöntemiyle inceledik. Hücre ölümündeki morfolojik değişiklikleri gözlemlemek için AO / EB boyama yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Katran ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinde sitotoksik dozda hücrelerin morfolojik değişimlerinde apoptozisin tetiklendiği gözlemlenmiştir. Ayrıca HUVEC hücresinde ise herhangi bir morfolojik değişiklik olmadığı sağlıklı hücre üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir.

Daha sonra olası sitotoksik etkisi hücrelerde hücre ölüm mekanizmalarından olan apoptotik yolağı aktifleştirerek mi yoksa nekrozdan hangisi ile gerçekleştiğini tespit etmek için Annexin V Apoptoz/Nekroz tayini yapıldı. Katran ektremiz doza bağımlı olarak 10 µg/ml, 20 µg/ml ve 30 µg/ml üç farklı dozda HCT-116 hücrelerini 24 saat ünkübe edildi. Sonrasında doza bağımlı olarak apoptotik yolağın arttığını ve hücre ölüm oranında ciddi bir yükselme olduğu belirlendi.

Uyguladığımız bitkinin HCT-116 ve HUVEC hücrelerinin hücre bölünmesinin hangi aşamasında durduğunu tespit etmek amacıyla hücre döngüsü analizi yaptık. Hücrelere dört farklı doz (0 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml) uyguladık artan dozlarda hücrelerin G0-G1 fazında daha fazla hücrenin kaldığı görülmektedir. Negatif dozda hücrelerin %58,8, 10 µg/ml hücrelerin %58,4, 20 µg/ml hücrelerin % 62.1 ve 30 µg/ml ise hücrelerin %70'i G0-G1 fazında hücre bölünmesi durmuştur. G0-G1 fazını geçen her hücre mutlaka bölüneceğinden dolayı uyguladığımız maddenin kanserli hücreleri G0-G1 fazında tutup hücreleri bir sonraki fazı geçmesini engelleyebilmesidir.

Apoptozun diğer bir belirteci olan mitokondral membran potansiyeli JC-1(5,5',6,6'-tetrachloro1,1',3,3'-tetra methyl benzimidazolyl carbocy anineiodide) ile analiz ettik. Analiz sonucunda HCT-116 hücresinin madde miktarının artması ile mitokondrilerdeki membranların porları açılarak yüksek oranda reaktif oksijenin sitoplazmaya geçmesi apoptoz aktivasyonuna yol açmıştır.

Hücre içi serbest radikal değişimini analiz etmek için hücreye geçirgen olan floresans bir prop kullanıldı. Bu prop ROS ile reaksiyona girdiğinde kırmızı floresans oluşturmaktadır. Katran ekstrem dozun artması ile hücre içerisindeki reaktif oksijen düzeyinde ciddi bir artış olduğu gözlemlenmiştir.

Sedir bitkimizin doza bağlı olarak hücreyi apoptotik yolağı indüklediğini, hücre içi ölüm miktarını artırdığını tespit ettik. Madde uyguladığımız hücre apoptotik yolu seçtiği görülmektedir. Maddelerimizin sitotoksik ve apoptotik etki mekanizmasını serbest radikal üretimini tetikleyerek gösterdiğini tespit ettik. Kanserli hücre üzerinde sitotoksik etki gösterirken sağlıklı hücre üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir. Bunlarda yola çıkarak kanser tedavisi için yeni bir kemoterapik ajan olabileceğini ve ileride 3 boyutlu hücre kültürü araştırmalarında ve ardından hayvan deneyleri gibi yeni projelere ışık tutacak ve özellikle kanser tedavisi için yeni ve özgün çalışma alanları doğuracaktır.

6. KAYNAKLAR

1. WHO. Preventing chronic diseases: a vital investment, in WHO press. Geneva: WHO Global report; 2005.
2. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS medicine 2006; 3(11):e442.
3. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. The Lancet 2006; 367(9524):1747-1757.
4. Hoyert DL, Heron MP, Murphy SL, Kung HC. Deaths: final data for 2003. National Vital Statistics Reports 2006; 54(13): 1–120.
5. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2016. CA: a cancer journal for clinicians 2016; 66.(1):7-30.
6. Macdonald JS. Oncology. 1999; 13(7 Suppl 3):33–34.
7. Rexroth G, Scotland V. Cardiac toxicity of 5-fluorouracil. Medizinische Klinik (Munich, Germany: 1983) 1994; 89(12): 680-688.
8. Aviles A, Arevila N, Diaz Maqueo JC, Gomez T, Garcia R, Nambo MJ. Leuk. Lymphoma. 1993; 11(3–4):275–279.
9. Kilickap S, Akgul E, Aksoy S, Aytemir K, Barista I. Doxorubicin-induced second degree and complete atrioventricular block. EP Europace 2005; 7(3): 227-230.
10. Manil L, Mahieu P, Couvreur P. Acute renal toxicity of doxorubicin (adriamycin) loaded cyanoacrylate nanoparticles. Pharmaceutical research 1995; 12(1):85-87.
11. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011; 144(5):646-674.
12. Alía M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). European Journal of Nutrition 2006; 45(1):19-28.
13. Pilatova M, Varinska L, Perjesi P, Sarissky M, Mirossay L, Solar P, et al. In vitro antiproliferative and antiangiogenic effects of synthetic chalcone analogues. Toxicology in Vitro 2010; 24(5):1347-1355.

14. Moghaddam G, Ebrahimi SA, Rahbar Roshandel N, Foroumadi A. Antiproliferative activity of flavonoids: influence of the sequential methoxylation state of the flavonoid structure. *Phytotherapy Research* 2012; 26(7):1023-1028.
15. Treasure J. Herbal medicine and cancer: an introductory overview. In *Seminars in Oncology Nursing* 2005 August; 21(3):177-183.
16. Sze DM, Miller K, Neilan B. Development of taxol and other endophyte produced anti-cancer agents. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* 2008; 3(1):14-19.
17. Mahata S, Maru S, Shukla S, Pandey A, Mugesh G, Das BC, et al. Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine* 2012; 12(1):15.
18. Marzo I, Naval J. Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: promises and pitfalls. *Biochemical pharmacology* 2013; 86(6):703-710.
19. Matic IZ, Aljančič I, Žižak Ž, Vajs V, Jadranin M, Milosavljević S, et al. In vitro antitumor actions of extracts from endemic plant *Helichrysum ivojinii*. *BMC complementary and alternative medicine* 2013; 13(1):36.
20. Shiezadeh F, Mousavi SH, Amiri MS, Iranshahi M, Tayarani-Najaran Z, Karimi G. Cytotoxic and apoptotic potential of *Rheum turkestanicum* Janisch root extract on human cancer and normal cells. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* 2013; 12(4):811.
21. Howat S, Park B, Oh IS, Jin YW, Lee EK, Loake GJ. Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects. *New biotechnology* 2014; 31(3):242-245.
22. Safarzadeh E, Shotorbani SS, Baradaran B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Advanced pharmaceutical bulletin* 2014, 4(Suppl 1), 421.
23. Expósito O, Bonfill M, Moyano E, Onrubia M, Mirjalili MH, Cusido RM, et al. Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 2009; 9(1):109-121.
24. Ostermann T, Raak C, Büssing A. Survival of cancer patients treated with mistletoe extract (Isador): a systematic literature review. *BMC cancer* 2009; 9(1): 451.

25. Liu B, Bian HJ, Bao JK. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer letters* 2010; 287(1):1-12.
26. Ali R, Mirza Z, Ashraf GM, Kamal MA, Ansari SA, Damanhour GA, et al. New anticancer agents: recent developments in tumor therapy. *Anticancer research* 2012; 32(7):2999-3005.
27. Tröger W, Ždrale Z, Stanković N, Matijašević M. Five-year follow-up of patients with early stage breast cancer after a randomized study comparing additional treatment with *viscum album* (L.) extract to chemotherapy alone. *Breast cancer: basic and clinical research* 2012; 6: BCBCR-S10558.
28. Weissenstein U, Kunz M, Urech K, Baumgartner S. Interaction of standardized mistletoe (*Viscum album*) extracts with chemotherapeutic drugs regarding cytostatic and cytotoxic effects in vitro. *BMC complementary and alternative medicine* 2014; 14(1):6.
29. Iwamoto LH, Vendramini-Costa DB, Monteiro PA, Ruiz ALTG, Sousa IMDO, Foglio MA, et al. Anticancer and anti-inflammatory activities of a standardized dichloromethane extract from *Piper umbellatum* L. leaves. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015; 2015.
30. Fulda S. Betulinic acid for cancer treatment and prevention. *International journal of molecular sciences* 2008; 9(6):1096-1107.
31. Gupta A, Naraniwal M, Kothari V. Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International journal of applied and natural sciences* 2012; 1(1):8-26.
32. Korkina L, Kostyuk V. Biotechnologically produced secondary plant metabolites for cancer treatment and prevention. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2012; 13(1):265-275.
33. Ramasamy S, Wahab NA, Abidin NZ, Manickam S, Zakaria Z. Growth inhibition of human gynecologic and colon cancer cells by *Phyllanthus watsonii* through apoptosis induction. *PLoS One* 2012; 7(4):e34793.
34. Csupor D, Blazsó G, Balogh Á, Hohmann J. The traditional Hungarian medicinal plant *Centaurea sadleriana* Janka accelerates wound healing in rats. *Journal of ethnopharmacology* 2010; 127(1):193-195.

35. Csapi B, Hajdú Z, Zupkó I, Berényi Á, Forgo P, Szabó P, et al. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytotherapy research* 2010; 24(11):1664-1669.
36. Chicca A, Tebano M, Adinolfi B, Ertugrul K, Flamini G, Nieri P. Anti-proliferative activity of aguerin B and a new rare nor-guaianolide lactone isolated from the aerial parts of *Centaurea deflexa*. *European journal of medicinal chemistry* 2011; 46(7):3066-3070.
37. Forgo P, Zupkó I, Molnár J, Vasas A, Dombi G, Hohmann J. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L. *Fitoterapia* 2012; 83(5):921-925.
38. Erel SB, Demir S, Nalbantsoy A, Ballar P, Khan S, Yavasoglu NUK, et al. Bioactivity screening of five *Centaurea* species and in vivo anti-inflammatory activity of *C. athoa*. *Pharmaceutical biology* 2014; 52(6):775-781.
39. Koc S, Isgor BS, Isgor YG, Shomali Moghaddam N, Yildirim O. The potential medicinal value of plants from Asteraceae family with antioxidant defense enzymes as biological targets. *Pharmaceutical biology* 2015; 53(5):746-751.
40. Solowey E, Lichtenstein M, Sallon S, Paavilainen H, Solowey E, Lorberboum-Galski H. Evaluating medicinal plants for anticancer activity. *The Scientific World Journal* 2014; 2014.
41. Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea* L. species from Turkey flora. *Food and chemical toxicology* 2011; 49(11):2914-2920.
42. Salla M, Fakhoury I, Saliba N, Darwiche N, Gali-Muhtasib H. Synergistic anticancer activities of the plant-derived sesquiterpene lactones salograviolide A and iso-seco-tanaparholide. *Journal of natural medicines* 2013; 67(3):468-479.
43. Park G, Kim HG, Hong SP, Kim SY, Oh MS. Walnuts (seeds of *Juglandis sinensis* L.) protect human epidermal keratinocytes against UVB-induced mitochondria-mediated apoptosis through upregulation of ROS elimination pathways. *Skin pharmacology and physiology* 2014; 27(3):132-140.
44. Wong FC, Woo CC, Hsu A, Tan BKH. The anti-cancer activities of *Vernonia amygdalina* extract in human breast cancer cell lines are mediated through

- caspase-dependent and p53-independent pathways. PLoS One 2013; 8(10):e78021.
45. Foo JB, Yazan LS, Tor YS, Armania N, Ismail N, Imam MU, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in caspase-3 deficient MCF-7 cells by *Dillenia suffruticosa* root extract via multiple signalling pathways. BMC complementary and alternative medicine 2014; 14(1):197.
 46. Moirangthem DS, Laishram S, Borah J, Kalita MC, Talukdar NC. *Cephalotaxus griffithii* Hook. f. needle extract induces cell cycle arrest, apoptosis and suppression of hTERT and hTR expression on human breast cancer cells. BMC complementary and alternative medicine 2014; 14(1):305.
 47. Khuri S, Shmoury MR, Baalbaki R, Maunder M, Talhouk SN. Conservation of the *Cedrus libani* populations in Lebanon: history, current status and experimental application of somatic embryogenesis. Biodiversity & Conservation, 2000; 9(9):1261-1273.
 48. Akrep M. Eskiçağ Anadolu'sunda Sedir Ağacının Önemi. Mavi Atlas 2013; 1:21-27.
 49. Bhattarai NK. Medical ethnobotany in the Karnali zone, Nepal. Economic Botany 1992; 46.3:257-261.
 50. Kurt Y, Kaçar MS, Isik K. Traditional tar production from *Cedrus libani* A. Rich on the Taurus Mountains in southern Turkey. Economic Botany 2008; 62.4:615.
 51. Kurt Y, Kaçar MS, Isik K. Isozyme Variation in Four Natural Populations of *Cedrus libani* A. Rich in Turkey. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 2008, 32.2: 137-145.
 52. Cetin H, Kurt Y, Isik K, Yanikoglu A. Larvicidal effect of *Cedrus libani* seed oils on mosquito *Culex pipiens*. Pharmaceutical biology 2009; 47.8:665-668.
 53. Dığrak M, İlçim A, Hakkı Alma M. Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives 1999; 13.7:584-587.
 54. Li WY, Chan SW, Guo DJ, Chung MK, Leung TY, Yu PHF. Water extract of *Rheum officinale* Baill. induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549

- and human breast cancer MCF-7 cell lines. *Journal of ethnopharmacology* 2009; 124.2:251-256.
55. Kumar M, Nagpal R, Verna V. Targeted cancer therapies: the future of cancer treatment. *Acta Bio Medica Atenei Parmensis* 2012; 83.3:220-233.
56. Zhang H, Qian Y, Liu Y, Li G, Cui P, Zhu Y, et al. *Celastrus orbiculatus* extract induces mitochondrial-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 2012, 32.4:621-626.
57. Lee PNH, Ho WS. Antiproliferative activity of gambogic acid isolated from *Garcinia hanburyi* in Hep3B and Huh7 cancer cells. *Oncology reports* 2013; 29.5:1744-1750.
58. Samarghandian S, Borji A, Farahmand SK, Afshari R, Davoodi S. *Crocus sativus* L.(saffron) stigma aqueous extract induces apoptosis in alveolar human lung cancer cells through caspase-dependent pathways activation. *BioMed research international* 2013; 2013.
59. Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC. *Kemoterapötik İlaçlar, Oktay Ş. Farmakoloji, Nobel Tıp Kitapevleri* 1998; 373-400.
60. Alabsi AM, Ali R, Ali AM, Al-Dubai SAR, Harun H, Abu Kasim NH, et al. Apoptosis induction, cell cycle arrest and in vitro anticancer activity of gonothalamin in a cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2012, 13.10:5131-5136.
61. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144.5:646-674.
62. Bertheau P, Lehmann-Che J, Varna M, Dumay A, Poirrot B, Porcher R, et al. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *The Breast* 2013; 22:S27-S29.
63. Obiorah IE, Fan P, Sengupta S, Jordan VC. Selective estrogen-induced apoptosis in breast cancer. *Steroids* 2014; 90:60-70.
64. Olsson M, Zhivotovsky B. Caspases and cancer. *Cell death and differentiation* 2011; 18.9:1441.
65. Öztürk M. *Methods for Cellular and Molecular Diagnostics in Human Pathology.* University Press House 2011.

66. Constance JE, Lim CS. Targeting malignant mitochondria with therapeutic peptides. *Therapeutic delivery* 2012; 3.8:961-979.
67. Sun Y, Gui T, Shimokado A, Muragaki Y. The role of Tricho- Rhino-Phalangeal Syndrome (TRPS)1 in apoptosis during embryonic development and tumor progression. *Cells* 2013; 2:496-505.
68. Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008; 9:378-90.
69. Blagosklonny MV. Carcinogenesis, cancer therapy and chemoprevention. *Cell Death and Differentiation* 2005; 12:592-602.
70. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2010; 60:277-300.
71. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2011; 411:342-347.
72. Ferlay J, Soerjomataram EM, Dikshit R, Eser S, Mathers C. Cancer incidence and mortality worldwide: International Agency for Research on Cancer 2013.
73. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2006; 6:392-401.
74. Benazzi C, Al-Dissi A, Chau CH, Figg WD, Sarli G, de Oliveira JT, et al. Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology. *The Scientific World Journal* 2014; 919570: 16.
75. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Molecular Medicine* 2015; 7:1-11.
76. Adjei IM, Blanka S. Modulation of the tumor microenvironment for cancer treatment: A biomaterials approach. *Journal of Functional Biomaterials* 2015; 6:81-103.
77. Wu CT, Lai JN, Tsai YT. The prescription pattern of Chinese herbal products that contain Dang-Qui and risk of endometrial cancer among Tamoxifentreated female breast cancer survivors in Taiwan: A population-based study. *Public Library of Science one* 2014; 9:e113887.
78. Piccolella M, Crippaa V, Messia E, Tetel M, Poletti A. Modulators of estrogen receptor inhibit proliferation and migration of prostate cancer cells. *Pharmacological Research* 2014; 79:13-20.

79. Binkhorst L, Mathijssen RH, Jager A, van Gelder T. Individualization of tamoxifen therapy: Much more than just CYP2D6 genotyping. *Cancer Treatment Reviews* 2015; 41:289-99.
80. Bisi A, Gobbi S, Merolle L, Farruggia G, Belluti F, Rampa A. et al. Design, synthesis and biological profile of new inhibitors of multidrug resistance associated proteins carrying a polycyclic scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 92:471-480.
81. Kozovska Z, Gabrisova V, Kucerova L. Colon cancer: Cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2014; 68:911-916.
82. Makkouk A, Weiner GJ. Cancer immunotherapy and breaking immune tolerance: new approaches to an old challenge. *Cancer Research* 2014; 75:5-10.
83. Eskander RN, Tewar KS. Immunotherapy: An evolving paradigm in the treatment of advanced cervical cancer. *Clinical Therapeutics* 2015; 37:20-38.
84. Chen G, Emens LA. Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2013; 62:203-16.
85. Ji HF, Li XJ, Zhang HY. Natural products and drug discovery. *EMBO reports* 2009; 10:194-200.
86. Baytop T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul Üniversitesi Yayınları: 3637, Ecz. Fak. No. 40, İstanbul; 1984. 240-376.
87. Baytop T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. Nobel Tıp Kitapevleri: İstanbul; 1999. 4- 10.
88. Başer HC. Phytochemical diversity in the flora of Turkey, plants of the Balkan Peninsula: into the Next Millenium, Proceeding of the 2nd Balkan Botanical Congress (Ed. N. Özhatay) 2001; 517–528.
89. Kandemir A, Beyazoğlu O. Köse dağlarının (Gümüşhane) tıbbi ve ekonomik bitkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2002; 6(3):148-157.
90. Ertuğ F. Bodrum yöresinde halk tıbbında yararlanılan bitkiler. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı. Bildiriler kitabı (Ed. K.H.C. Başer ve N. Kırimer) 2004; 76–93.

91. Özgüven M, Şekeroğl N. Agricultural practices for high yield and quality of black cumin (*Nigella sativa* L.) cultivated in Turkey. *Acta Horticulturae* 2007; 756:329-338.
92. Mehdi WA, Zainulabdeen JA, Mehde AA. Investigation of the antioxidant status in multiple myeloma patients: effects of therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2013; 14:3663-7.
93. Sezgin C. Kanserde Bitkilerle Tedavide Örnek Uygulamalar. *MerkezeFendi Geleneksel Tıp Dergisi, Bitkilerle Tedavi Sempozyumu 2010; Zeytinburnu, İstanbul.*
94. Sgadari C, Toschi E, Palladino C, Barillari G, Carlei D, Cereseto A, et al. Mechanism of paclitaxel activity in Kaposi's Sarcoma. *Journal of Immunology* 2000; 165:509-517.
95. De Smet PA. Health risks of herbal remedies: an update. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2004; 76:1–17.
96. Nemati F, Dehpouri AA, Eslami B, Mahdavi V, Mirzanejad S. Cytotoxic properties of some medicinal plant extracts from Mazandaran, Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 2013; 15:e8871.
97. Kma L. Roles of plant extracts and constituents in cervical cancer therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2013; 14:3429-36.
98. Handa SS, Khanuja SP, Longo G, Rakesh DD. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. *International Centre For Science and High Technology* 2008; Trieste: ICS UNIDO.
99. Zou DM, Brewer M, Garcia F, Feugang JM, Wang J, Zang R, et al. Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutrition Journal* 2005; 4:25-6.
100. Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Research* 2000; 301:5- 7.
101. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *Physiology* 2004; 19:124-128.
102. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 2007; 3: 495-516.
103. O'Brien MA, Kirby R. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2008; 18:572-585.

104. Öztürk M. Apoptoz ve Kanser. Bölüm 1. Kanser Biyolojisi. Pediatrik Onkoloji Editör; Alp Özkan. Nobel Tıp Kitabevi 2009, İstanbul, Sayfa: 63-82.
105. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* 2012; 15:1-14.
106. Lockshin RA, Zakeri Z. Cell death in health and disease. *Journal of cellular and molecular medicine* 2007; 11(6):1214-1224.
107. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2015; 16:2129-2144.
108. Kustermann S, Boess F, Bunes A, Schmitz M, Watzele M, Weiser T, et al. A label-free, impedance-based real time assay to identify drug-induced toxicities and differentiate cytostatic from cytotoxic effects. *Toxicology in Vitro* 2013; 27:1589-1595.
109. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* 2005; 11:127-52.
110. Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods in Molecular Biology* 2011; 740:1-6.
111. Drake WP, Ungaro PC, Mardiney Jr, MR. Formalin-fixed cell preparations as standards for use in the automated trypan blue cytotoxic assay. *Transplantation* 1972; 14(1):127.
112. Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *Journal of Neuroscience Methods* 1987; 20:83-90.
113. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65:55-63.
114. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K, et al. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-

- soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 1996; 19:1518-20.
115. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* 1985; 24:119-24.
116. Malich G, Markovic B, Winder C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology* 1997; 124:179-92.
117. Kurt Y, Kaya N, Işık K. Isozyme variation in four natural populations of *Cedrus libani* A. Rich. in Turkey. *Turk J Agric For* 2008a; 32:137-145.
118. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Smigal C, Thun MJ, et al. Cancer statistic, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57(1):43-66.
119. Edwards BK, Howe HL, Ries LA, Thun MJ, Rosenberg HM, Yancik R, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973–1999, featuring implications of age and aging on US cancer burden. *Cancer* 2002; 94(10):2766-2792.
120. Levin KE, Dozois RR. Epidemiology of large bowel cancer. *World J Surg* 1991; 15(5):p. 562-7.
121. Buğra D. Kolon, Rektum, Anal Bölge Anatomisi. *Kolorektal Özel Sayısı. Türkiye Klinikleri Journal of Surgery* 2004; 9(1):1-9.
122. Kuşakçioğlu Ö. *Kolorektal Kanser Hastalıkları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2003; 1-27.
123. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistic, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999; 49(1):33-64.
124. <http://www.saglik.gov.tr/TR/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFF71BE64510F6C8BC92747D9FFFE7A1226>, Sağlık Bakanlığı Web Sitesi.
125. Gönen Ö. *Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi*, *Kolorektal Özel Sayısı. Türkiye Klinikleri Journal of Surgery* 2004; 9:57-65.
126. Majerus E, Birnbaum, Picus J. *Colorectal Malignancies*. İn: Govindan R, Arquette M (Eds.). *The Washington Manual of Oncology* 2002.
127. Hawk ET, Limburg PJ, Viner JL. Epidemiology and prevention of colorectal cancer. *The Surgical clinics of North America* 2002; 82(5):905-941.

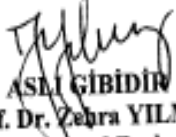
128. Shike M, Winawer SJ, Greenwald PH, Bloch A, Hill MJ, Swaroop SV. Primary prevention of colorectal cancer. The WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. Bulletin of the World Health Organization 1990; 68(3):377.
129. Levin B. Nutrition and colorectal cancer. Cancer 1992, 70(6 Suppl): p. 1723-6.
130. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer: a population-based study. New England journal of medicine 1990; 323(18):1228-1233.
131. Brentnall TA, Haggitt RC, Rabinovitch PS, Kimmey MB, Bronner MP, Levine, DS, et al. Risk and natural history of colonic neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. Gastroenterology 1996; 110(2):331-338.
132. Otake S, Takeda H, Suzuki Y, Fukui T, Watanabe S, Ishihama K, et al. Association of visceral fat accumulation and plazma adiponectin with colorectal adenoma: Evidence for Participation of Insulin Rezistance. Clin Cancer Res 2005; 11:3642-6.
133. Keku TO, Lund PK, Galanko J, Simmon JG, Woosley JT, Sandler RS. Insulin resistance, apoptosis and colorectal adenoma risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14(99):2076-81.58.
134. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willet WC. Physical aktivity, obesity and risk for colon cancer and adenoma in men. Ann Intern Med 1995; 122(5):327-34.
135. Kayacık, H. Orman ve park ağaçlarının özel sistematiği. Cilt:1 (Gymnospermae) İ.Ü. Orm. Fak. Yayın No: 1105/98 1967, 384 s.
136. Evcimen BS. Türkiye'nin yaşlı sedirleri. İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi; 1961; Series A, Vol 11, No 1.
137. Ata C. Silvikültür Tekniği. Bartın: Bartın Orman Fakültesi Yayınları, 1995.
138. Loizzo MR, Saab A, Tundis R, Statti GA, Lampronti I, Menichini F, et al. Phytochemical analysis and in vitro evaluation of the biological activity against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) of Cedrus libani A. Rich. Phytomedicine 2008; 15(1-2):79-83.

139. Dığrak M, İlçim A, Hakkı Alma, M. Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 1999; 13(7):584-587.
140. Yeşilada E, Gürbüz I. Shibata H. Türkiye’de anti-ülserojenik halk ilaçlarının anti-*Helicobacter pylori* aktivitesinin taranması. *Etnofarmakoloji Dergisi* 1999; 66 (3):289-293.



7. EKLER

HARRAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ Etik Kurul Kararı	
TARİH	: 06.05.2019
OTURUM	: 05
SAAT	: 13:00

HRÜ/19.05.34	<p>Karar: Üniversitemiz Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi İsmail KOYUNCU'nun yürütücüsü olduğu "Geleneksel Yöntemlerle Hazırlanan Sedir Katranının Antikanser Etkisinin İncelenmesi" başlıklı çalışma için Etik kurul iznine gerek duyulmadığına;</p> <p>Oy birliği ile karar verilmiştir.</p> <p style="text-align: center;"> ASLI GİBİDİR Prof. Dr. Zehra YILMAZ Etik Kurul Başkanı</p>
---------------------	---



T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU VE BEYAN BELGESİ

Öğrencinin

Numarası :165302008
Adı, Soyadı : Kadir EĞİ
Anabilim Dalı (Bölümü) : Tıbbi Biyokimya
Programı : Yüksek Lisans Doktora
Tezin Adı: Geleneksel Yöntemlerle Hazırlanan Sedir Katranının Antikanser Etkisinin İncelenmesi

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yukarıda başlığı belirtilen yüksek lisans tez çalışmamın; *kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç* kısımlarından oluşan toplam 36 sayfalık kısmına ilişkin, 19/08/2019 tarihinde şahsım/ danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, benzerlik oranı %17'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kabul/Onay ve Bildirim sayfaları hariç,
- 2- Kaynakça hariç
- 3- Alıntılar hariç
- 4- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Yukarıda bilgileri verilen tezin, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından kabul edilen lisansüstü orijinallik raporu alınması uygulama esasları ile belirtilen azami benzerlik oranlarını aşmadığını ve bütün bilgilerin, akademik kurallara uygun olarak toplanıp sunulduğunu, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçları andığımı, blok şeklinde alıntılar yapmadığımı ve tüm alıntıların bilimsel atıf kuralları çerçevesinde kaynağını gösterdiğimi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ile Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesinin 8. maddesinde yer alan etik ihlallerden herhangi birisinin yer almadığını, etik ihlal tespiti halinde, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca, diplomamın iptal edilmesini kabul ediyorum.

Gereğini saygılarımla arz ederim. 26/08/2019

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı-Soyadı: Kadir EĞİ

İmzası:

Yukarıda yer alan raporun ve beyanın doğruluğunu onaylarım. 26/08/2019

Danışmanın

Unvanı-Adı-Soyadı: Dr. Öğr. Üyesi İsmail Koyuncu

İmzası:

Yrd. Doç. Dr. İsmail Koyuncu
K.R.U. Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Başkanı
Tıbbi Biyokimya A.B.D.

Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme kodu: 19-Ağu-2019 09:32 +03
 NUMARA: 1161334831
 Kelime Sayısı: 8556
 Gönderildi: 1

Benzerlik Endeksi
%17

Kaynağa göre Benzerlik
 İnternet Sources: %12
 Yayınlar: %2
 Öğrenci Ödevleri: %11

GELENEKSEL YÖNTEMLERLE
 HAZIRLANAN SEDİR KATRANININ
 ANTİKANSER ETKİSİNİN
 İNCELENMESİ Kadir Eği tarafından

Yrd. Doç. Dr. İsmail KÖYÜNCÜ
 H.R.Ü. Araştırma ve Uygulama Merkezi
 Tıbbi Biyokimya ABD

2% match (29-May-2016 tarihli internet) http://acikerisim.deu.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/12345/13239/203500.pdf?isAllowed=v&sequence=1
2% match (20-Ara-2017 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Kahramanmaraş Sütcü İmam University on 2017-12-20
1% match (24-Eyl-2018 tarihli internet) https://vdocuments.site/documents/ekstaksiyon-yoentemleri.html
1% match (12-May-2016 tarihli internet) http://acikerisim.deu.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/12345/10107/266918.pdf?sequence=1&isAllowed=y
1% match (13-Eki-2009 tarihli internet) http://istanbulsaqlik.gov.tr/w/tez/pdf/radyoloji/dr_meral_ekinci_kaya.cdf
1% match (27-Tem-2018 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Istanbul Medipol Üniversitesi on 2018-07-27
1% match (07-May-2019 tarihli internet) http://adudspace.edu.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11607/3266/M%c3%bcrgan%20AYDEM%c4%b0F%c4%b0ncelenen%20%281%29.docx?isAllowed=v&sequence=1
1% match (01-May-2012 tarihli internet) http://www.kimya.gov.tr/2015
1% match (27-Mar-2016 tarihli internet) http://www.mcoonline.org/content/12/9/2394.full.pdf
1% match (07-May-2019 tarihli internet) http://adudspace.edu.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11607/1366/TEZ.pdf?isAllowed=v&sequence=2
< 1% match (17-Nis-2017 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Trakya University on 2017-04-17
< 1% match (20-May-2011 tarihli internet) http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01b.pdf
< 1% match (01-Eyl-2015 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Ege Üniversitesi on 2015-09-01
< 1% match (01-Haz-2015 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Ege Üniversitesi on 2015-06-01
< 1% match (yayınlar) COŞGUN, Selma, ÇALIKOĞLU, Mehmet and SARIBASAK, Halil, "Toros Sediri (Cedrus libani A. Rich.), Atlas Sediri (Cedrus atlantica Manett.) ve Kıbrıs Sediri (Cedrus brevifolia (Hooker fil.) Henry.) türlerinin 11 yıllık artım ve büyümelemlerinin karşılaştırılması", Batı Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2011.
< 1% match (02-Şub-2019 tarihli internet) https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/24665/DPTX_2008_2_11160_0_54818_0_91675.pdf?isAllowed=v&sequence=1

28.08.2019

Ulusal Tez Merkezi | Tez Form Yazdır

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10286602
Yazar Adı / Soyadı	KADİR EÇİ
T.C.Kimlik No	25655556122
Telefon	5396567062
E-Posta	kadir499_@hotmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	Geleneksel Yöntemlerle Hazırlanan Sedir Katranının Antikanser Etkisinin İncelenmesi
Tezin Tercümesi	The Investigation Of Anticancer Effect Of Cedar Tar Prepared By Traditional Methods
Konu	Biyokimya = Biochemistry
Üniversite	Harran Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Bilim Dalı	Biyokimya Bilim Dalı
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2019
Sayfa	36
Tez Danışmanları	DR. ÖĞR. ÜYESİ İSMAİL KOYUNCU
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	

28.08.2019

İmza: 